



Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche de la régulation et de la fonction de la protéine mtCLIC dans des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial

Mercy, Ludovic

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 23. Jun. 2020



2

FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR
Faculté des Sciences

**Recherche de la régulation et de la fonction de la protéine mtCLIC dans
des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Ludovic Mercy

Juin 2002

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur

Téléphone □ + 32(0)81.72.44 – Téléfax = + 32(0)81.72.4420

E-mail □ joelle.jonet@fundp.ac.be

<http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Recherche de la régulation et de la fonction de la protéine mtCLIC dans
des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial

MERCY Ludovic

2.1

2.2 Résumé

De nombreuses pathologies sont associées à un dysfonctionnement mitochondrial. Les mécanismes impliqués dans ces situations sont multiples et encore peu compris mais nécessitent une communication moléculaire entre les organites et plus particulièrement entre les mitochondries non fonctionnelles et le noyau. Le concept de la «communication rétrograde» qui sous-tend ce phénomène implique que la mitochondrie renseigne le noyau sur son état d'activité à travers l'activation de facteurs de transcription capables de modifier l'expression de gènes nucléaires codant ou non pour des protéines mitochondriales.

mtCLIC, un gène codant pour un canal à chlore mitochondrial, a été identifié par la technique de «RT-PCR differential display» comme étant un gène différentiellement exprimé dans des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial.

Dans ce travail, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de *mtCLIC*. Nous avons montré que la surexpression de la protéine mtCLIC dans les L929 est sensible au TNF □ et à une augmentation de la concentration en calcium. La voie de signalisation conduisant à la surexpression de mtCLIC dans les cellules L929 déplétées en ADNmt semble impliquer les facteurs de transcription p53 et CREB, deux facteurs activés dans ces cellules. Cette protéine, de fonction encore inconnue, pourrait également jouer un rôle important dans le maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial. En effet, la modulation de l'expression de *mtCLIC* ou l'incubation en présence de l'IAA-94, un inhibiteur de canaux à chlore, modifie le potentiel de membrane mesuré par l'accumulation de la sonde Rhodamine123 dans les mitochondries.

Nous avons donc contribué à la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression du gène codant la protéine mtCLIC. Cette protéine pourrait être potentiellement impliquée dans le maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial encore observé dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2002

Promoteur □ T. Arnould

1	INTRODUCTION GENERALE	7
1.1	Mitochondrie □ structures et fonctions	7
1.1.1	Origine et évolution	7
1.1.2	Génétique mitochondriale	8
1.1.3	Structure et fonctions mitochondriales	9
1.2	Mutations du génome mitochondrial et pathologies associées.	20
1.2.1	Homoplasmie et Hétéroplasmie	21
1.2.2	Mutations dans le génome mitochondrial	22
1.2.3	Réarrangements de l'ADN mitochondrial	24
1.3	Les cellules rho⁰ □ un modèle d'études.	25
1.3.1	Obtention des cellules rho ⁰ (□ ⁰)	25
1.3.2	Caractéristiques des cellules □ ⁰	26
1.3.3	Les cellules cybrides comme modèle d'études	30
1.4	La communication moléculaire rétrograde mitochondrie-noyau	30
1.5	Les canaux à chlore: diversité et ambiguïté	31
1.5.1	Fonctions des canaux à chlore	32
1.5.2	CLIC □ Une famille de canaux à chlore intracellulaire	33
1.5.3	mtCLIC, un canal à chlore mitochondrial	35
	Résumé des recherches antérieures à ce mémoire :	38
	Objectifs de ce mémoire	39
	Plasmides utilisés au cours de ce travail	41
2	MATERIEL ET METHODES	42
2.1	CULTURE CELLULAIRE ET SOUS-CULTURES	42
2.1.1	Matériel	42
2.1.2	Sous-cultures	43
2.2	WESTERN BLOTTING	44
2.2.1	Principe	44
2.2.2	Méthodes	45
2.2.3	Préparation des lysats cellulaires	46
2.2.4	Dosage des protéines par la méthode de Bradford	46
2.2.5	Préparation des échantillons pour le Western blotting	47
2.2.6	Composition des gels et migration	47

2.2.7	Transfert des protéines sur une membrane de PVDF	48
2.2.8	Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation.	49
2.3	MESURE DE LA CYTOTOXICITE	50
2.3.1	Principe du dosage de l'activité LDH	50
2.3.2	Méthode	51
2.4	TRANSFECTION	51
2.4.1	Technique et outils	52
2.4.2	Méthode	52
2.4.3	Dosage de l'activité luciférase	56
2.5	Immunofluorescence et microscopie confocale	57
2.5.1	Principe du microscope confocal	57
2.5.2	Marquage immunocytochimique	58
2.6	Test de liaison du facteur de transcription p53 en multipuits	59
2.6.1	Principe du test	59
2.6.2	Extraction nucléaire	60
2.6.3	Dosage de la liaison de p53 à sa séquence consensus à partir d'extraits de protéines nucléaires.	61
2.7	Mesure du potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la rhodamine 123 (R123) et marquage des mitochondrie au Nonyl Acridine Orange (NAO)	62
2.7.1	Principe	63
2.7.2	Méthode	63
2.8	Analyse statistique des résultats	64
3	RESULTATS ET DISCUSSION	65
3.1	Confirmation de la surexpression du gène codant la protéine mtCLIC en cas de	

Liste des abréviations

AA	Antimycine A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
AIF	Apoptosis inducing factor
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique
ANT	Adénine nucléotide translocase
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
□-gal	□-galactosidase
BSA	Bovine serum albumin
CaM	Calmoduline

CaMK	Calmoduline-dependent kinase
CBP	CREB binding protein
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLC	Chloride channel
CLIC	Chloride intracellular channel
COX	Cytochrome oxydase
CREB	cAMP-response element binding protein
CTL	contrôle(s)
DHG	Dulbecco's modified eagle's medium high glucose
D-loop	Displacement loop
DTT	Dithiothrétol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylene diamine tetra acétate
EPO	Erythropoïétine
FADH ₂	Flavine Adénine Dinucléotide réduit
FBS	Fetal bovine serum
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoro-méthoxyphénylhydrazone
GABA	acide □-amino butyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine triphosphate
HB	Hypotonic Buffer
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	Horse radish peroxydase
HSP	Heavy strand promoter
IAA-94	Acide indanyloxyacétique
IP3	Inositol triphosphate
LDH	Lactate déshydrogénase
LHON	Leber's hereditary optical neuropathy
LSP	Light strand promoter
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MELAS	Mitochondrial encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episode
MERRF	Myoclonic epilepsy and ragged red fibers
MME	Membrane mitochondriale externe
MMI	Membrane mitochondriale interne
MRP	Mitochondrial RNA processing enzyme
mtTFA	mitochondrial transcription factor A
mV	millivolt
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NAO	Nonyl acridine orange
NF□B	Nuclear factor □B
NPPB	5-Nitro-2-(3-PhenylPropylamino)-Benzoïc acid
NRF	Nuclear respiratory factor
ONPG	O-nitrophénylgalactopyranoside
ORI	Origine de réplication
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGC1	PPAR□co-activator
PM	Poids moléculaire

PNPP	p-nitrophénylphosphate	
PPAR□	Peroxisome proliferator activated receptor □	
PTP	Permeability transition pore	
PVDF	Polyvinylidène fluoride	
RLU	Relative light unit	
ROS	Reactive oxygen species	
SDS	Sodium dodécyl sulfate	
SOD	Superoxyde dismutase	
TBP	TATA box-binding protein	
TBS	Tris buffer saline	
TEMED	TetraMethylEthyleneDiamine	
TIM	Translocase of the inner membrane	
TMB	Tétra-Méthyl Benzidine	
TMRE	Tetramethyl rhodamine ethylester	
TMRM	Tetramethyl rhodamine methylester	
TNF□	Tumor necrosis factor □	
TOM	Translocase of the outer membrane	
UCP	Uncoupling protein	
VDAC	Voltage-dependent anion channel	
VDCC	Voltage-dependent calcium channel	
VEGF	Vascular-endothelial growth factor	
dysfonctionnement mitochondrial		66
3.2 Confirmation de la localisation mitochondriale de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt		67
3.3 Recherche des mécanismes de régulation de l'expression du gène codant la protéine mtCLIC dans les cellules L929 et L929 déplétées en ADN mitochondrial		68
3.3.1	Recherche de l'activité de p53 dans les cellules L929 et L929dADNmt	69
3.3.2	Toxicité induite par le TNF□	71
3.3.3	Effets de faibles concentrations en TNF□ sur l'abondance de mtCLIC et l'activité transcriptionnelle dépendante de p53	72
3.3.4	Dosage de la liaison du facteur de transcription p53 à sa séquence consensus	74
3.3.5	Recherche de l'implication de p53 et CREB dans la régulation de l'expression de mtCLIC	76
3.3.6	Recherche du rôle potentiel du calcium dans la régulation de l'abondance de la protéine mtCLIC	81
3.4 Recherche de l'abondance et de la localisation subcellulaire de l'orthologue humain de mtCLIC, CLIC4, dans des lignées cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial.		83
3.5 Recherche d'une fonction biologique potentielle de la protéine mtCLIC dans les mitochondries de cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial.		85
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	92
5	BIBLIOGRAPHIE	98

3 INTRODUCTION GENERALE

3.1 Mitochondrie □ structures et fonctions

3.1.1 Origine et évolution

L'hypothèse concernant l'origine des mitochondries est assez ancienne et postule que les mitochondries actuelles dérivent d'un ancêtre commun à tous les eucaryotes. Une bactérie aérobie et parasite se serait établie il y a 1,5 milliard d'années dans une cellule hôte dotée d'un métabolisme glycolytique (Margulis, 1975). Un schéma illustrant les origines possibles des mitochondries est présenté à la figure 1.1. Cette théorie endosymbiotique de l'origine des mitochondries est aujourd'hui reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique, même s'il subsiste une certaine controverse quant à l'espèce bactérienne ayant donné naissance à cet organite. De par leur parenté phylogénique, il est également admis que le génome mitochondrial ancestral proviendrait du sous-groupe des α -protéobactéries, dont font partie les genres *Rickettsia*, *Anaplasma* et *Ehrlichia*.

Les études portant sur les séquences des génomes bactériens et mitochondriaux confortent l'hypothèse d'un ancêtre commun. Cet ancêtre est probablement à chercher parmi les eubactéries (Andersson *et al.*, 1998b; Gray *et al.*, 2001).

Une fois internalisé, le génome mitochondrial a subi une évolution rétrograde continue au cours du temps (Andersson *et al.*, 1998a). Une conséquence directe de la symbiose a été une réduction du nombre de gènes initialement codés par l'ADN mitochondrial, se traduisant par une diminution de la taille de ce génome chez l'homme et d'autres espèces. Les gènes codant pour des enzymes impliquées dans des fonctions telles que la biosynthèse des acides aminés et des nucléosides, et de la glycolyse anaérobie ont été pris en charge progressivement par la cellule hôte. Certains gènes mitochondriaux ont donc été transférés vers le génome nucléaire, phénomène que l'on observe encore actuellement (Wallace, 1999).

Le génome résultant de cette compaction est appelé génome proto-mitochondrial.

3.1.2 Génétique mitochondriale

3.1.2.1 Le génome mitochondrial

L'hérédité des mitochondries est entièrement maternelle (Kaneda *et al.*, 1995) (Cummins, 2000). Le génome mitochondrial ne possède pas d'intron et n'est pas structuré par des protéines histones. Le génome mitochondrial renferme, en outre, moins de 10 % de séquences non codantes sous forme de fragments intergéniques (Gray *et al.*, 1998). Il possède, chez l'homme, une taille de 16,6 kb et se présente sous la forme de plusieurs molécules circulaires et bicaténaïres par mitochondrie (figure 1.2). Les deux brins de ce génome se distinguent par leur composition en bases : le brin lourd (Heavy strand, HS) renferme plus de résidus guanines tandis que le brin léger (Light Strand, LS) contient plus de cytosines. La dénomination lourde et légère fait référence au nombre de produits géniques codés par chacun des brins. Les brins lourds et légers codent respectivement pour 29 et 18 produits géniques. Chez l'homme, l'ADN mitochondrial code pour 37 produits, soit 13 peptides, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et 16S). Les 13 peptides codés entrent dans la composition de la chaîne de transporteurs d'électrons et du complexe F0-F1 ATPsynthase, assurant les phosphorylations oxydatives au niveau de la membrane mitochondriale interne. Ces 13 peptides ne représentant à peine qu'un pourcent de l'ensemble des protéines mitochondriales, un système d'importation protéique complexe est donc nécessaire à l'adressage correct des protéines mitochondriales synthétisées dans le cytosol vers les différents compartiments mitochondriaux. Ces mécanismes seront plus amplement détaillés au point 1.1.3.1.

3.1.2.2 Transcription, traduction et réplication

Chaque brin de l'ADN mitochondrial possède un promoteur unique LSP (Light Strand Promoter) et HSP (Heavy Strand Promoter), tous deux présents dans la région de la boucle D (Displacement loop). Ces deux promoteurs permettent une transcription bidirectionnelle inverse et indépendante. La transcription du génome mitochondrial est permise grâce à l'unique facteur de transcription mitochondrial identifié à ce jour, appelé mtTFA (Transcription Factor A) (Choi *et al.*, 2001). Le mécanisme principal de régulation de la transcription de l'un ou l'autre des deux brins est en effet fonction de la concentration en mtTFA. A faible concentration, le mtTFA active le LSP alors qu'il active le HSP à forte

concentration. De plus, au-delà d'une certaine abondance, la transcription des deux brins est inhibée. Le génome mitochondrial ne possédant pas d'intron, le produit de la transcription est un transcrit polycistronique qui sera clivé ultérieurement par des RNase spécifiques.

Au niveau de la mitochondrie, la synthèse protéique peut être inhibée par le chloramphénicol, comme c'est le cas également pour la synthèse protéique bactérienne. Cette parenté de sensibilité au chloramphenicol renforce l'idée d'une origine bactérienne de la mitochondrie. La machinerie de traduction mitochondriale, composée de mitoribosomes, de petits ARNt et d'ARNm non coiffés, permet la synthèse de 13 protéines, qui vont s'insérer au niveau de la membrane mitochondriale interne. Remarquons que dans la mitochondrie, le code génétique utilisé diffère quelque peu du code génétique «□universel□. Citons par exemple, que le codon stop «□universel□ UGA code pour le tryptophane dans les mitochondries de cellules de mammifères et de levure (figure 1.3).

En plus de posséder un promoteur propre, chaque brin du génome mitochondrial possède une origine de réplication (ORI) distincte. La réplication des deux brins se fait en sens inverse avec un léger décalage dans le temps. L'initiation de la réplication est en fait couplée à la transcription du brin léger, qui génère, après clivage par la MRP (Mitochondrial RNA Processing enzyme), un transcrit pouvant servir de *primer* à la polymérase gamma mitochondriale (Figure 1.4) (Geuskens *et al.*, 1981). Cette dernière débute alors la réplication du brin lourd à partir de son origine de réplication (O_h). Ajoutons encore que la réplication de l'ADN mitochondrial n'est pas synchronisée avec celle de l'ADN nucléaire.

3.1.3 Structure et fonctions mitochondriales

La mitochondrie est un organe dont la taille et la forme varient en fonction du type cellulaire, de son état de différenciation et de son activité. De manière générale, l'activité métabolique d'une cellule peut être mise en relation avec le nombre de mitochondries qu'elle possède. Notons également que la variabilité de la morphologie, de la localisation et du mouvement des mitochondries est conditionnée par leur interaction avec les composants du cytosquelette (Linden *et al.*, 1989) (Boldogh *et al.*, 1998). Il apparaît comme de plus en plus évident que le concept de mitochondrie en tant qu'organe isolé ne correspond en fait pas à la réalité. Il est donc assez illusoire de décrire avec précision la forme et le nombre de mitochondries par cellule. En effet, les techniques d'imagerie modernes, telle que la microscopie confocale, couplée à l'utilisation de sondes fluorescentes, permettent désormais

d'appréhender la mitochondrie en tant que réseau dynamique (Yaffe, 1999). De fait, certains auteurs n'hésitent plus à parler de réseau ou de réticulum mitochondrial, par analogie avec le réticulum endoplasmique. Ces deux organites sont d'ailleurs souvent physiquement très proches et communiquent entre eux au niveau moléculaire (Rizzuto *et al.*, 1998). Cet aspect sera détaillé au point 1.1.3.4.2.2 consacré à l'importance de ces organites dans l'homéostasie du calcium intracellulaire. Le maintien et la dynamique d'un réseau tubulaire de mitochondrie vont nécessiter des événements de fusion et de fission, permettant le branchement ou la rupture de l'organite. Ces événements vont permettre de réguler le nombre de copies de l'organite ainsi que sa morphologie (Bleazard *et al.*, 1999). Chez la levure, ces événements, régulièrement espacés dans le temps (Nunnari *et al.*, 1997), sont régulés par des GTPases situées au niveau de la membrane mitochondriale externe (Hales *et al.*, 1997). Une GTPase apparentée à la dynamine et nommée Dnm1p s'assemble aux futurs sites de fission par un mécanisme impliquant Fis1p et médie la division mitochondriale (figure 1.5) (Gammie *et al.*, 1995). La fusion, quant à elle, est régulée par une autre GTPase transmembranaire, Fzo1p (fuzzy onions). Dans les cellules de mammifères, l'homologue de Dnm1p, Drp1, s'assemble également en structures multimériques, encerclant la MME (membrane mitochondriale externe) et médiant la division mitochondriale (Smirnova *et al.*, 2001).

Du point de vue structural, la mitochondrie possède, tout comme certaines bactéries, un double réseau membranaire qui va délimiter deux compartiments distincts: l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Perkins *et al.*, 2000).

3.1.3.1 Les membranes mitochondriales.

La membrane mitochondriale externe (MME) est composée de 40 % de lipides et de 60 % de protéines. Elle contient une série d'enzymes impliquées dans de nombreuses activités telles que l'oxydation de l'épinéphrine, la dégradation du tryptophane et l'allongement des acides gras. La membrane mitochondriale externe est particulièrement perméable aux ions et aux petites molécules. Cette perméabilité est assurée, entre autres, par la présence de porines, protéines intrinsèques formant de larges canaux membranaires non sélectifs. L'ouverture des porines (comme la protéine VDAC; Voltage Dependent Anion Channel) est régulée par le potentiel de membrane mitochondrial et assure le trafic de nombreux solutés hydrophiles d'un poids moléculaire inférieur ou égal à 10 kDa (Mannella, 1998). On trouve également des protéines telles que l'acyl-CoA synthétase impliquée dans le métabolisme des acides gras,

ainsi que des membres de la famille Bcl2 à fonction anti-apoptotique. La MME joue donc un rôle important dans le contrôle de la mort cellulaire par apoptose.

La membrane mitochondriale interne (MMI), quant à elle, possède un rapport protéine / lipide plus élevé (1 □ 3). La surface de la MMI est plus grande que celle de la MME, grâce à une conformation en crêtes augmentant sa surface de contact et optimisant ainsi les réactions se déroulant à son niveau, telles les phosphorylations oxydatives. Sa composition particulièrement riche en cardiolipine (diphosphatidylglycérol) et pauvre en cholestérol la rend relativement rigide, ce qui facilite l'assemblage correct des différentes sous-unités composant la chaîne de transporteurs d'électrons. Cette composition particulière est utilisée expérimentalement afin de quantifier l'abondance de la population mitochondriale, en utilisant, par exemple, le Nonyl Acridine Orange (NAO) qui se lie à la cardiolipine (Mileykovskaya *et al.*, 2001). Un tableau comparatif de la composition lipidique des membranes mitochondriales interne et externe est présenté à la figure 1.6. La membrane mitochondriale interne est, de plus, imperméable à la plupart des ions. Cette perméabilité sélective autorise le maintien à ce niveau d'un potentiel de membrane mitochondrial. On trouve également dans la membrane interne, une série de protéines impliquées dans des fonctions mitochondriales telles que la chaîne de transporteurs d'électrons, la phosphorylation de l'ADP par la FO-F1 ATP synthase, le transport de nombreux métabolites (comme le NADH, le pyruvate et les acides gras), et la régulation des flux ioniques. L'échange ATP mitochondrial / ADP est également assuré à son niveau par les isoformes 1 et 3 de l'antiport ANT (Adénine Nucléotide Translocase) (Fiore *et al.*, 1998).

Les membranes mitochondriales externe et interne présentent de nombreuses zones de contact où se situent des pores de translocation constitués de protéines issues des deux membranes. On peut observer dans ces zones de contact intermembranaire, la formation de mégacanaux ou PTP (Permeability Transition Pore), dont la limite d'exclusion est d'environ 1500 Da. Des protéines telles que VDAC et l'ANT participent à la formation de ce pore (figure 1.7). Ce PTP est régulable et permet, après ouverture, une transition de la perméabilité de la MMI. Cette transition de perméabilité est un événement important pour la mitochondrie et pour la cellule. En effet, il s'accompagne du relarguage de nombreux composés habituellement séquestrés dans la mitochondrie tels que le cytochrome c et l'AIF (Apoptosis Initiating Factor). L'ouverture de ce PTP peut être déclenchée par différentes conditions telles qu'une moindre abondance en ATP, une production accrue de radicaux libres (Raha *et al.*, 2001) ou une dérégulation de l'homéostasie calcique (Ermak *et al.*, 2002).

Les complexes protéiques mitochondriaux sont composés de sous-unités codées majoritairement par le génome nucléaire, mais également par le génome mitochondrial. Cette caractéristique implique donc une coordination entre les mécanismes de transcription et de traduction nucléaires et mitochondriaux qui fait en sorte que les protéines mitochondriales, qu'elle que soit leur origine, soient présentes au bon moment au bon endroit. Pour permettre cette coordination, bon nombre de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire doivent être adressées et importées dans la mitochondrie. Les protéines impliquées dans l'importation de protéines codées par le génome nucléaire et synthétisées dans le cytosol sont appelées translocase (TOM □ Translocase of outer membrane, et TIM □ Translocase of inner membrane). L'adressage des protéines mitochondriales synthétisées dans le cytosol vers la mitochondrie est dicté par une séquence d'adressage spécifiant la destination finale de la protéine et implique le passage à travers les membranes mitochondriales et la prise de conformation active de la protéine. En fonction de la destination finale de la protéine, elle pourra être bloquée sélectivement au niveau des membranes externe et interne ou dans l'espace intermembranaire (Bauer *et al.*, 2000; Horst *et al.*, 1997) (Daum *et al.*, 1982). Cette fonction complexe d'importation nécessite des protéines réceptrices, des canaux de translocation et des protéines chaperonnes et co-chaperonnes associées en complexes multimoléculaires. Une représentation ainsi qu'un modèle de fonctionnement de ces complexes multiprotéiques présents en MME et en MMI sont présentés aux figures 1.8 et 1.9.

3.1.3.2 La matrice mitochondriale

C'est au niveau de la matrice mitochondriale que l'on trouve l'ADN mitochondrial, présent en plusieurs copies, ainsi que la machinerie assurant la transcription et la réplication du génome mitochondrial. La matrice mitochondriale assure également un rôle de stockage d'ions et est le siège de nombreuses réactions métaboliques telles que le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras.

3.1.3.3 L'espace intermembranaire

L'espace intermembranaire mitochondrial joue un rôle essentiel dans la production d'énergie. En effet, la chaîne de transporteurs d'électrons expulse des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ce transfert crée donc à la fois un gradient de pH (Δ pH) et un potentiel électrochimique de membrane ($\Delta\psi$ m). La

résultante de ces deux forces, appelée «force proton motrice» s'exprime en mV et varie, en conditions physiologiques, de 180 à 220 mV (figure 1.10). La mitochondrie utilise le retour des protons vers la matrice selon le gradient de concentration pour générer de l'ATP via une enzyme appelée FO-F1 ATPsynthase.

Une série de sondes fluorescentes, s'accumulant dans les mitochondries actives sont d'ailleurs disponibles commercialement et permettent une mesure de ce potentiel de membrane. Parmi celles ci, citons la rhodamine 123, que nous utiliserons dans ce travail, et ses dérivés (TMRE, tetramethyl rhodamine ethylester et TMRM, tetramethyl rhodamine methylester) qui sont des cations lipophiles utilisés dans de nombreuses applications (Scaduto *et al.*, 1999). Une autre sonde utilisée est JC-1 qui existe sous forme monomérique et s'agrège en fonction de l'élévation du potentiel de membrane mitochondrial. Cette agrégation est corrélée à un déplacement de sa longueur d'onde d'émission (Salvioli *et al.*, 1997). Ces différentes sondes ne permettent malheureusement pas le traitement des cellules marquées avec des fixateurs comme la paraformaldéhyde, rendant impossible leur visualisation en microscopie confocale. Une nouvelle gamme de sondes fluorescentes a donc été développée, sondes qui sont retenues dans les cellules fixées □ les sondes de type MitoTracker, telles que le MitoTracker Red, qui réagit avec les groupements thiols et est retenu plus spécifiquement dans la mitochondrie en fonction du potentiel de membrane (Buckman *et al.*, 2001).

3.1.3.4 Fonctions mitochondriales

A coté de sa fonction principale de production d'énergie, la mitochondrie participe également à la thermogenèse, au cycle de l'urée ainsi qu'à la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Delbart, 2000). Elle joue également un rôle dans l'homéostasie calcique de la cellule (Duchen, 2000) et a été associée à l'apoptose dans de nombreux modèles cellulaires (Kroemer *et al.*, 2000).

3.1.3.4.1 Production d'énergie

La cellule peut obtenir de l'énergie à partir de différents substrats qui seront oxydés. Parmi ceux-ci, le glucose et les acides gras peuvent servir à générer des coenzymes réduits (tels que le NADH, Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit et le FADH₂, Flavine Adénine Dinucléotide réduit), qui donneront leurs électrons à la chaîne de transporteurs d'électrons, respectivement au niveau des complexes I et II. Le NADH est produit par la glycolyse au niveau du cytosol et est ensuite importé dans la matrice mitochondriale (Saraste, 1999). Le

NADH utilisé provient également de l'oxydation de l'acétyl-CoA en CO_2 au cours du cycle de Krebs, qui s'accompagne de la réduction de 3 NAD^+ en $3 \text{ NADH} + \text{H}^+$. Le transfert de deux électrons vers l'oxygène moléculaire à partir d'une molécule de NADH ($E_{\text{NADH}} = -320 \text{ mV}$) se déroule en plusieurs étapes. La chaîne de transporteurs d'électrons est constituée d'une série de couples redox dont le potentiel redox est croissant. Chaque transporteur est successivement réduit par la capture d'électrons provenant du transporteur précédent. Il est ensuite oxydé en perdant ses électrons au profit du transporteur suivant. Un tableau reprenant les différentes caractéristiques des complexes formant la chaîne de transporteurs d'électrons est présenté à la figure 1.11. L'accepteur final de la chaîne de transporteurs d'électrons est donc l'oxygène, qui sera réduit en eau. L'énergie libérée au cours du transfert d'électrons va servir à transférer des protons dans l'espace intermembranaire. Leur retour dans la matrice est ensuite assuré par la FO-F1 ATP synthase pour générer de l'énergie sous forme d'ATP. L'ATP produit est ensuite échangé avec de l'ADP cytosolique et pourra être utilisé par la cellule. Cet échange est assuré par l'ANT (Adénine Nucléotide Translocase).

Le complexe I (NADH/Ubiquinone réductase) catalyse la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol, en lui transférant les électrons du NADH. Ce transfert peut être inhibé par la roténone et l'amital. Le passage des électrons à travers le complexe I s'accompagne d'un transfert de quatre protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Le complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase), quant-à-lui, capture deux électrons au succinate (un intermédiaire du cycle de Krebs) et les transfère sur le FAD. Ces électrons serviront à réduire l'ubiquinone. Le transfert d'électrons à travers le complexe II ne pompe pas de protons et constitue une voie de transfert d'électrons de plus faible énergie. Ce complexe est inhibé par le malonate. Ajoutons encore que toutes les sous-unités du complexe II sont codées par le génome nucléaire (Rustin *et al.*, 2002).

Au niveau du complexe III (Ubiquinol/cytochrome c oxydoréductase), l'ubiquinol est oxydé, et les électrons fournis vont servir à réduire le cytochrome c, protéine membranaire périphérique qui ne fait partie d'aucun complexe de la chaîne respiratoire. Le trajet des électrons dans le complexe III est inhibé par l'antimycine A et la stigmatelline. A ce niveau, quatre protons sont également pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Finalement, le complexe IV (cytochrome c oxydase) catalyse le transfert des électrons sur l'oxygène moléculaire. Le cyanure empêche le passage des électrons à travers ce

complexe. On observe qu'à ce niveau trois ou quatre protons sont transférés dans l'espace intermembranaire.

L'énergie libérée par le flux des électrons va donc servir à générer un gradient de concentration en protons, et donc un potentiel électrochimique. Un schéma illustrant le transport des électrons à travers ces différents complexes est présenté à la figure 1.12 (Rawn, 1990).

La FO-F1 ATP synthase permet de passer d'un potentiel de membrane à une énergie chimique. Cette enzyme est constituée de deux sous-unités, la partie apicale F1, support de l'activité catalytique qui fait protrusion dans la matrice, et un segment basal FO (O pour sensible à l'oligomycine), intégré dans la membrane mitochondriale interne. Les protons empruntent la partie FO pour traverser la membrane mitochondriale interne. Ce faisant, ils déclenchent la rotation de la partie F1, véritable rotor moléculaire. C'est une modification de conformation, induite par le passage des protons, qui va altérer l'affinité de la protéine pour l'ADP et le phosphate inorganique (Pi) et mener à la formation puis à la libération d'ATP. La figure 1.13 présente l'architecture de l'enzyme ainsi que son mode de fonctionnement.

3.1.3.4.2 Autres fonctions mitochondriales

3.1.3.4.2.1 Thermogenèse

L'entièreté du gradient de protons n'est pas utilisée par les phosphorylations oxydatives pour la synthèse d'ATP. Une partie de cette énergie est dissipée sous forme de chaleur. La protéine UCP1 (Uncoupling Protein 1) présente dans les adipocytes bruns des animaux hibernant, des rongeurs et des nouveaux-nés humains, permet d'annihiler le gradient de protons en leur offrant une voie de retour vers la matrice différente de la FO-F1 ATPsynthase. L'oxydation des substrats dans ces cellules va donc presque exclusivement mener à la production de chaleur. Les protéines UCPs existent sous différentes isoformes chez les mammifères. Outre l'UCP1, on distingue l'UCP2 ubiquiste et l'UCP3 présente dans le muscle squelettique. Les protéines UCPs présentes au niveau de la MMI sont des protéines d'environ 300 acides aminés, dont la séquence présente six domaines transmembranaires, caractéristiques des protéines de transport de la MMI (Kozak *et al.*, 2000). La régulation de ces UCPs dépend de nombreux facteurs. Par exemple, le GDP (Guanine Diphosphate) inhibe l'expression de l'UCP1, tandis que les acides gras l'induisent. L'acide rétinol peut également induire l'expression des UCPs 1 et 2 (Rial *et al.*, 1999). Différents facteurs de

transcription comme NRF1 (Nuclear Respiratory Factor), et co-activateurs comme PGC1 (PPAR □ co-activator) ont été impliqués dans l'activation de la transcription des gènes de l'UCP2. Plus récemment, un lien indirect a été mis en évidence entre PPAR □ (peroxisome proliferator activated receptor □), un facteur de transcription impliqué dans la différenciation adipocytaire, et la transcription du gène de l'UCP2 (Medvedev *et al.*, 2001). Il a également été montré que les souris transgéniques qui surexpriment UCP3 dans le muscle squelettique sont hyperphagiques et résistantes à l'obésité (Clapham *et al.*, 2000). Outre leur rôle avéré ou supposé dans la thermogénèse, les UCPs participent également au contrôle de la production de ROS (Reactive Oxygen Species) en abaissant le potentiel de membrane mitochondrial (Echtay *et al.*, 2002). Echtay *et al* émettent d'ailleurs l'hypothèse que les protéines UCPs étaient, à l'origine, un moyen de défense contre la production de ROS induite par le froid. L'expression de ces protéines est d'ailleurs augmentée par le froid. A côté de ces protéines découplantes naturelles, il existe des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives tels que le FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoro methoxy phenylhydrazone), un acide faible et hydrophobe agissant comme protonophore et utilisé expérimentalement pour découpler la mitochondrie.

3.1.3.4.2.2 Homéostasie du Calcium

Le calcium est un messager secondaire important au niveau cellulaire. Il est notamment impliqué dans des mécanismes tels que la sécrétion, la contraction des cellules musculaires et la prolifération cellulaire. Le calcium présent dans le cytosol et / ou le noyau peut se lier à la calmoduline (CaM), et ainsi moduler l'activité de protéines kinases telles que les calmodulin-dependent Kinases (CaMK) et de phosphatases comme la calcineurine. Ces activités peuvent notamment réguler la liaison à l'ADN et / ou la transactivation de certains facteurs de transcription et ainsi induire la transcription de gènes tels que c-fos (Sheng *et al.*, 1990) ou certaines interleukines (Tsuboi *et al.*, 1994). Par exemple, la liaison du calcium à la calmoduline entraîne l'activation de la CaMK IV, qui active le facteur de transcription CREB en le phosphorylant sur la sérine en position 133 (Wu *et al.*, 2001). Le rôle de la mitochondrie dans le contrôle de l'homéostasie calcique est connu depuis quarante ans, mais ce n'est que récemment que l'attention s'est portée sur la question de savoir si la mitochondrie participe ou non au cycle du calcium en conditions physiologiques.

Au niveau cellulaire, la concentration cytosolique en calcium libre est maintenue aux alentours de 100 nM et peut augmenter lors d'une stimulation qui entraîne l'ouverture des

canaux ioniques présents à la fois dans la membrane plasmique et au niveau du réticulum endoplasmique. L'influx calcique dépend de la cinétique de ces canaux, et pourra se manifester sous forme de pics brefs ou soutenus. En général, il se manifeste sous forme de vagues, pouvant mener à l'augmentation locale de la concentration en calcium. La libération des stocks intracellulaires de calcium impliquera donc à la fois la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. En réponse à certaines hormones ou neurotransmetteurs, un messager intracellulaire, l'inositol triphosphate (IP3), est généré par l'hydrolyse du phosphatidyl inositol par une phospholipase c au niveau de la membrane plasmique. Cette molécule se fixe sur son récepteur au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, permettant ainsi la libération du calcium qui y est retenu. Cette libération s'effectue également via des récepteurs à la ryanodine, et ce, lors de l'augmentation locale de calcium cytosolique, provoqué par exemple dans les cellules chromaffines, par l'ouverture du VDCC (Voltage-Dependent Calcium Channel) (Montero *et al.*, 2000).

Au niveau intracellulaire, l'influx calcique se manifeste de manière oscillatoire et peut se transmettre de cellules en cellules (Guthrie *et al.*, 1999). De par sa proximité avec les zones de relargage du calcium par le réticulum endoplasmique, la mitochondrie est affectée directement par les variations locales de concentration en calcium cytosolique. Ces zones de contacts privilégiées entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique forment des microdomaines à fortes concentrations cytosoliques en calcium (Rizzuto *et al.*, 1998).

La membrane mitochondriale externe étant perméable aux petites molécules, c'est donc au niveau de la membrane interne que le calcium emprunte un canal spécifique. Cet uniport électrogène est dépendant du potentiel de membrane généré par les phosphorylations oxydatives, et son ouverture est régulée par la concentration locale en calcium cytosolique (Carafoli, 1987). On peut ainsi mesurer une dépolarisation transitoire du potentiel de membrane mitochondrial lors de l'import de calcium. De plus, une diminution du potentiel de membrane induite, par exemple, par le FCCP, permet de diminuer la prise de calcium par la mitochondrie. Dans certaines conditions pathologiques associées à une dépolarisation mitochondriale, l'effet tampon exercé par la mitochondrie sur les variations de la concentration en calcium cytosolique est donc compromis.

Bien que le calcium importé n'est pas entièrement présent sous forme libre dans la matrice, mais également complexé aux groupements phosphates et aux phospholipides (David, 1999), il régule positivement l'activité de déshydrogénases du cycle de Krebs (Maechler *et al.*, 2000). Sa prise en charge permet donc une augmentation du potentiel de

membrane mitochondrial (Robb-Gaspers *et al.*, 1998) et une production accrue d'ATP (Rizzuto *et al.*, 2000). Néanmoins, la capture excessive de calcium par la mitochondrie est un processus anormal pouvant mener notamment à la mort cellulaire (Ermak *et al.*, 2002).

La mitochondrie peut donc accumuler du calcium lorsque sa concentration locale augmente. Elle peut ensuite le relarguer lentement dans le cytosol et jouer ainsi un vrai rôle de tampon pour le calcium. L'exportation de calcium vers le cytosol est assurée par un antiport, qui échange deux ions Na^+ contre un ion Ca^{++} . Dans certaines conditions pathologiques comme l'hypoxie, ces échangeurs peuvent fonctionner en sens inverse et importer le calcium dans la mitochondrie (Griffiths *et al.*, 1998). Ces deux systèmes de transport localisés dans la MMI permettent un transport cyclique du calcium permettant à la mitochondrie de jouer un rôle dans des processus cellulaires tels que la sécrétion de neurotransmetteurs ou la contraction des cellules musculaires. De plus, par son implication importante dans les voies de signalisation dépendantes du calcium, on peut facilement imaginer qu'un dysfonctionnement mitochondrial va entraîner une dérégulation de la concentration en ions calcium et de nombreuses réponses cellulaires (Biswas *et al.*, 1999). Les variations de concentration de cet ion pourraient donc être perçues comme un signal renseignant la cellule sur le fonctionnement de la mitochondrie. Le rôle du calcium en tant que messager intracellulaire entre la mitochondrie et le noyau sera abordé au point 1.3.2.5. Un schéma présentant un modèle de régulation de la concentration en calcium par le réticulum endoplasmique et la mitochondrie est présenté à la figure 1.14.

3.1.3.4.2.3 Mitochondrie et apoptose

L'objectif de ce mémoire n'étant pas centré sur l'étude de l'apoptose dépendante de la mitochondrie, nous n'aborderons pas ce sujet en détail. Néanmoins, vu son importance, nous allons mentionner quelques points essentiels, éclairant le rôle de la mitochondrie dans le processus de la mort cellulaire programmée.

L'apoptose dépendante de la mitochondrie est un processus qui se déroule en plusieurs étapes. Dans une première phase, dite d'induction, la cellule perçoit un signal inducteur qui peut être, par exemple, la fixation d'un ligand sur son récepteur (Fas-Fas ligand, TNF□...) ou des dommages générés à l'ADN. Dans un deuxième temps, la cellule intègre les différents signaux pro et anti-apoptotiques, et si la balance favorise l'apoptose, de nombreux facteurs entraînent généralement une augmentation de perméabilité des membranes mitochondriales. La troisième phase, dite d'exécution, est initiée par le relargage mitochondrial de molécules

pouvant mener essentiellement à l'activation d'une classe particulière de protéases, les caspases (cystein-dependent aspartate-specific protease).

La mitochondrie renferme en effet des protéines qui peuvent moduler positivement ou négativement le déroulement de l'apoptose. Parmi les protéines pro-apoptotiques, citons le cytochrome c, qui une fois relargué dans le cytosol, s'associe avec Apaf1 et la caspase 9 pour activer la pro-caspase 3 et ainsi déclencher une réaction en chaîne menant à la mort cellulaire (Goldstein *et al.*, 2000). La protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) va quant à elle donner lieu à la fragmentation directe de l'ADN, qui est une caractéristique de l'apoptose en phase terminale (Susin *et al.*, 1999). On retrouve également au sein de la mitochondrie des procaspases telle que la caspase 9, et différents membres de la famille Bcl2 ayant des fonctions pro (Bax, Bad) ou anti-apoptotique (Bcl2, Bcl-X_L).

La libération de ces différents facteurs dans le cytosol est probablement médiée par l'ouverture du PTP, déclenchée, entre autres, par les stress oxydatifs et le calcium (Hajnóczky *et al.*, 2000). Les protéines de la famille Bcl2 exerceraient d'ailleurs leurs fonctions pro ou anti-apoptotiques en modulant positivement ou négativement la perméabilité de la MMI au niveau du PTP (Figure 1.15) (Shimizu *et al.*, 1999). Les différents modes d'activation, ainsi que la chronologie précise de ces événements est encore sujet à controverses et nous ne développerons pas davantage ce sujet faisant l'objet de nombreuses recherches -(Kroemer *et al.*, 2000) (De Giorgi *et al.*, 2002).

3.1.3.5 Mitochondrie et production de radicaux libres

Au niveau de la chaîne des transporteurs d'électrons, 2 à 4 % des électrons sont directement cédés à l'oxygène moléculaire au niveau des complexes I et III (Kakinuma *et al.*, 1977) (Sankarapandi *et al.*, 1999). Ceci donne naissance à des formes appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS) (figure 1.16). Ces ROS présentent des électrons non appariés et sont donc instables et très réactionnels. Les ROS engendrent un stress oxydatif au niveau cellulaire et principalement au niveau de la mitochondrie, qui en est à la fois la principale source et la première cible. De plus, les systèmes de réparation rudimentaires de l'ADNmt la rendent encore plus vulnérable (Lenaz, 1998).

Les radicaux libres principalement produits par la mitochondrie sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), qui s'attaque aux centres fer-soufre de certaines enzymes, le peroxyde d'hydrogène résultant de la conversion spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) de l' $O_2^{\cdot-}$

en H_2O_2) et le radical hydroxyl produit par la réaction de Fenton en présence de Fe^{2+} (OH). Les stress oxydatifs induisent une peroxydation lipidique touchant principalement les phospholipides contenant des acides gras polyinsaturés comme la cardiolipine (Paradies *et al.*, 2000), une oxydation des protéines ainsi que des mutations et des délétions dans l'ADN mitochondrial (Shigenaga *et al.*, 1994) (Raha *et al.*, 2001). Ajoutons encore qu'ils sont associés à certaines pathologies comme le cancer et la maladie d'Alzheimer (Datta *et al.*, 2000).

A côté de leurs effets cytotoxiques et délétaires, ils jouent également un rôle dans la communication moléculaire entre la mitochondrie et le noyau. En effet, la production accrue de ROS par la mitochondrie peut induire l'expression de certains gènes comme la glutathione peroxydase (Brambilla *et al.*, 1997) ou le cytochrome c_1 (Suzuki *et al.*, 1998). L'expression de ces gènes est probablement sous le contrôle de facteurs de transcription dont l'activité est fonction de l'état redox de la cellule, comme par exemple NF- κ B.

La mitochondrie est donc un organite impliqué dans de nombreux processus vitaux pour la cellule (figure 1.17). Il est donc facile d'imaginer qu'un dysfonctionnement mitochondrial représente un stress important pour la cellule. Etant donné la double contribution des génomes nucléaire et mitochondrial à la composition protéique de la mitochondrie, les mutations affectant les fonctions mitochondriales peuvent avoir également deux origines. Le chapitre suivant va donc essayer de passer rapidement en revue les différentes mutations pouvant toucher la mitochondrie et altérer son fonctionnement.

3.2 Mutations du génome mitochondrial et pathologies associées.

L'ADN mitochondrial est plus sensible aux mutations que l'ADN nucléaire, du fait de l'absence d'histone protectrice et d'intron, en raison de sa proximité avec des sites de production de ROS et de la faible efficacité des systèmes de réparation. En effet, les mitochondries ne possèdent que l'uracil glycosylase et ne savent donc corriger que la déamination des cytosines (Chatterjee *et al.*, 2001). Le système de réparation pour les dimères de pyrimidines est absent, et de plus, l'ADN polymérase γ mitochondriale n'a pas d'activité «proofreading» (Wallace, 1999). Pour ces raisons, le taux de mutations dans le génome mitochondrial est 10 à 20 fois plus élevé que dans le génome nucléaire (Wallace *et al.*, 1987).

On a longtemps pensé également que les systèmes de réparation de l'ADN étaient absents dans la mitochondrie, affirmation qui ne semble plus exacte aujourd'hui (Bohr *et al.*, 1999).

3.2.1 Homoplasmie et Hétéroplasmie

Au sein d'une mitochondrie, l'ADN est présent en plusieurs copies. De ce fait, lorsqu'une mutation survient dans l'une ou plusieurs de ces copies, la mitochondrie renferme un mélange d'ADN sauvages et mutés. Cet état est appelée hétéroplasmie. Les génomes mitochondriaux mutés et sauvages vont ensuite se répartir de manière inégale au fil des générations cellulaires, l'un des deux types pouvant alors devenir prédominant et mener à un état homoplasmique (figure 1.18). Ce phénomène de ségrégation répllicative est appelé ségrégation stochastique (Kagawa *et al.*, 2001). Une grande difficulté est que le résultat phénotypique d'une mutation mitochondriale varie en fonction de la proportion d'ADN mitochondrial touché au sein de l'individu (Wallace *et al.*, 1995). Une même mutation pourra, en outre, donner lieu à des symptômes cliniques différents en fonction du taux d'hétéroplasmie et de l'organe touché (Novotny *et al.*, 1986) (Jun *et al.*, 1994) (Masucci *et al.*, 1995). Ce phénomène est appelé recouvrement. A l'inverse, des mutations différentes de l'ADNmt peuvent conduire à un phénotype unique, phénomène appelé convergence.

Les altérations dans le génome mitochondrial qui affectent les fonctions mitochondriales peuvent être très différentes. On retrouve ainsi des mutations ponctuelles de type «*missens*», des mutations affectant la synthèse protéique mitochondriale, des délétions et des insertions (Wallace *et al.*, 1992) (P.Lestienne, 1999). Au niveau nucléaire, les mutations peuvent affecter directement ou indirectement les fonctions mitochondriales en touchant soit des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne de transporteurs d'électrons, pour des protéines impliquées dans l'adressage des protéines mitochondriales, ou bien encore des gènes impliqués dans la régulation du génome mitochondrial.

La distinction entre mutations mitochondriales et nucléaires affectant la mitochondrie est en général basée sur l'observation du type de transmission du syndrome. En effet, une pathologie liée à une mutation nucléaire aura une hérédité de type mendélienne, alors que les mutations mitochondriales sont uniquement transmises par la mère.

3.2.2 Mutations dans le génome mitochondrial

Le nombre de pathologies associées à une mutation dans le génome mitochondrial est grandissant. Ces mutations vont donc altérer des protéines de la chaîne de transporteurs d'électrons, des ARN de transfert et des ARN ribosomiques (figure 1.19). Le but ici n'est pas de faire une liste exhaustive des nombreuses pathologies mitochondriales, mais plutôt d'illustrer, par quelques exemples, les différentes façons dont peut être affectée la mitochondrie lorsqu'une mutation survient dans son génome. La carte du génome mitochondrial humain ainsi que les emplacements des différentes mutations l'affectant est disponible sur le réseau internet (MITOMAP □ www.gen.emory.edu/mitomap.html). L'abondance des mitochondries au sein des cellules d'un tissu étant souvent fonction de leur activité métabolique, il n'est pas étonnant que les tissus possédant une activité mitochondriale importante soient les plus sévèrement touchés par des dysfonctionnements de l'activité mitochondriale. De fait, les pathologies mitochondriales sont souvent caractérisées par des désordres nerveux, musculaires et hépatiques (Munnich *et al.*, 2001).

3.2.2.1 Mutations ponctuelles affectant des protéines impliquées dans les phosphorylations oxydatives

Les différents gènes codant pour les protéines entrant dans la composition de la chaîne de transporteurs d'électrons peuvent être la cible de mutations. Par exemple, la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON) est due, dans 50 à 70 % des cas à la substitution de l'arginine en position 11778 par une histidine (R11778H), touchant ainsi la sous-unités 4 de la NADH déshydrogénase (Wallace *et al.*, 1988a). Une autre pathologie menant à la cécité est la dystrophie pigmentaire rétinienne (NARP) (Holt *et al.*, 1990) dans laquelle le gène de la sous-unités 6 de la FO-F1 ATPsynthase subit une mutation ponctuelle (T8993G) entraînant un assemblage ralenti des sous-unités de l'enzyme ainsi que son instabilité (Nijtmans *et al.*, 2001). La sévérité des symptômes est proportionnelle au degré d'hétéroplasmie. En effet, la maladie évolue vers un désordre neurodégénératif progressif (encore appelé syndrome de Leigh) lorsque le degré d'hétéroplasmie dépasse les 95 %. La mort survient toujours avant l'homoplasmie. De plus, les symptômes vont bien souvent varier en fonction de cette hétéroplasmie, rendant difficile l'identification de la mutation causale.

3.2.2.2 Mutations ponctuelles affectant les ARN de transfert codés par le génome mitochondrial

Ces mutations sont les plus fréquentes au niveau mitochondrial (Schon *et al.*, 1997) et entraînent donc une traduction erronée des protéines mitochondriales. Une des plus étudiées est la pathologie caractérisée par le symptôme MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers) (Chomyn, 1998; Wallace *et al.*, 1988b). Les symptômes cliniques apparaissent lorsque plus de 85% des génomes mitochondriaux sont touchés. C'est une encéphalomyopathie caractérisée par des épilepsies myocloniques, de l'ataxie cérébrale ainsi qu'une dégénérescence musculaire. On peut également observer chez ces patients une prolifération et une accumulation subsarcolemmique de mitochondries dans les cellules musculaires, révélées par une coloration au trichrome de Gomori comme des fibres rouges ayant donné leur nom à cette pathologie.

La mutation la plus fréquemment observée et responsable de ce syndrome est située en position 8344 (A8344G), dans un gène codant pour un ARN de transfert spécifique de la lysine (Shoffner *et al.*, 1990). Le nombre d'ARNt^{lys} va diminuer dans la mitochondrie en raison non pas d'une diminution de sa transcription mais d'une instabilité de l'ARN de transfert. La capacité à charger des lysines est ainsi réduite de 50 à 60 % (Enriquez, *et al.*, 1995). La conséquence de cette mutation est une terminaison prématurée de la traduction mitochondriale. Le taux de synthèse protéique mitochondrial est donc affecté, et ce, quel que soit le contenu en lysine du produit de traduction (Masucci *et al.*, 1995). Cette constatation a mené ces auteurs à relier cette réaction à la réponse stringente rencontrée dans les bactéries. En effet, lorsqu'un acide aminé devient limitant, pour quelle que raison que ce soit, la bactérie réagit en diminuant sa synthèse protéique globale. Cette similarité de réponse nous rappelle encore une fois l'origine bactérienne de la mitochondrie.

L'incidence de cette mutation sur la mitochondrie est assez importante. On constate en effet, une diminution sévère de la consommation d'oxygène, corrélée à une moindre production d'ATP induite par une déficience des complexes I et III (Wallace *et al.*, 1988b).

D'autres pathologies sont associées à des mutations dans les ARN de transfert. Citons encore la maladie neurodégénérative progressive MELAS (Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episode) (Shoffner *et al.*, 1995) (Goto *et al.*, 1995). La mutation MELAS (A3243) dans l'ADN mitochondrial peut causer des encéphalomyopathies

ou le diabète de type II (mellitus) (Kobayashi *et al.*, 1990; Newkirk *et al.*, 1997) en fonction de la ségrégation stochastique de l'ADNmt muté au sein des différents tissus du patient.

3.2.3 Réarrangements de l'ADN mitochondrial

Outre les mutations, le génome mitochondrial, peut subir d'autres réarrangements de type insertion-délétion. Des délétions peuvent survenir et priver ainsi la mitochondrie d'importantes séquences codantes. Les sites de délétions se situent principalement entre l'ORI du brin lourd et celle du brin léger. Elles se produisent probablement lors du cycle de réplication du génome mitochondrial, lorsque le brin lourd parental est sous forme simple brin. La taille de ces délétions est très variable, allant de quelques nucléotides à plusieurs Kb (figure 1.20) (Shoffner *et al.*, 1995).

Beaucoup de pathologies sont désormais clairement associées à un dysfonctionnement mitochondrial. Néanmoins, les mécanismes précis par lesquels un dysfonctionnement mitochondrial conduit aux effets phénotypiques de ces pathologies sont encore mal connus. Il est donc nécessaire de développer des modèles d'étude fiables. La mise au point récente de modèles murins permet désormais d'appréhender la pathophysiologie de ces maladies mitochondriales (Inoue *et al.*, 2000). En effet, la génération de souris possédant une mutation ponctuelle au sein de leur ADNmt (Wallace, 2001) ou déficientes pour un gène nucléaire impliqué dans une fonction mitochondriale, comme le mtTFA ou la MnSOD (Wallace, 2000) permet de mieux cerner les mécanismes physiologiques sous-jacents aux pathologies mitochondriales. Des essais thérapeutiques sont également développés à partir de ces modèles.

Le développement de différents modèles cellulaires a également contribué à l'avancement des recherches sur les maladies mitochondriales. Parmi ceux-ci, les cellules déplétées en ADN mitochondrial offrent de nombreuses perspectives. Nous allons maintenant passer en revue deux modèles cellulaires, à savoir les cellules déplétées artificiellement en ADN mitochondrial (□⁰) et un modèle plus physiopathologique, les cellules cybrides, obtenues par repopulation de cellules □⁰ avec des mitochondries issues de patients.

3.3 Les cellules rho⁰ □ un modèle d'études.

3.3.1 Obtention des cellules rho⁰ (□⁰)

La cellules □⁰ est un outil précieux permettant l'étude de la contribution du génome mitochondrial à l'activité cellulaire (King *et al.*, 1989) et la recherche du rôle de la mitochondrie dans les voies de signalisation. Ces cellules sont obtenues par un traitement chronique au bromure d'éthidium qui s'intercale potentiellement au niveau de l'ADN et de l'ARN double brin. Son action, qui vise plus spécifiquement le génome mitochondrial, nécessite de trente à cinquante passages en culture et s'explique par l'inhibition de l'hélicase et de la polymérase □ mitochondriale (Radsak *et al.*, 1971). La réplication et la transcription du génome mitochondrial sont dès lors inhibées et le génome mitochondrial est dilué progressivement au cours des divisions cellulaires (Nass, 1970). Enfin, en ajoutant un inhibiteur de l'activité mitochondriale, on peut sélectionner des cellules ne dépendant plus de la mitochondrie pour produire de l'ATP et générer une population clonale de cellules □⁰ (figure 1.21). Notons que dans le cas d'une population non clonale, la présence continue de bromure d'éthidium dans le milieu de culture est nécessaire pour éviter la réversibilité de phénotype (Smith, 1977). Au sein de la cellule déplétée en ADN mitochondrial, les 13 peptides codés par le génome mitochondrial sont absents, rendant la chaîne de transporteurs d'électrons non fonctionnelle. La cellule □⁰ est donc incapable de maintenir l'activité des phosphorylations oxydatives et utilise la glycolyse pour assurer sa production en ATP. La cellule □⁰ acidifie donc le milieu de culture très rapidement par accumulation d'acide lactique.

La caractérisation de l'efficacité de la déplétion en ADN mitochondrial dans les cellules □⁰ peut être réalisée par différentes méthodes, notamment en mesurant l'activité de la cytochrome c oxydase (Morais, 1996) ou la respiration mitochondriale. La technique PCR (Polymerase Chain Reaction) est également utilisée afin de détecter la présence d'ADN mitochondrial résiduel. La charge en ATP peut être déterminée, et des marquages en immunofluorescence de protéines marqueurs comme COX I (sous-unités I de la cytochrome oxydase), codées par le génome mitochondrial peuvent nous renseigner sur l'efficacité de la déplétion en ADNmt et la pureté de la population cellulaire (Arnould *et al.*, 2002).

3.3.2 Caractéristiques des cellules \square^0

Etant donné le rôle prépondérant de la mitochondrie dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, on comprend aisément l'intérêt suscité par les cellules \square^0 , qui malgré l'absence de respiration peuvent néanmoins survivre. Elles font donc l'objet de nombreuses études (Chandel *et al.*, 1999) (Jiang *et al.*, 1999) (Miller *et al.*, 1996) (Kennedy *et al.*, 1998).

3.3.2.1 Croissance des cellules \square^0

Une caractéristique importante des cellules \square^0 est leur auxotrophie pour l'uridine. Cette auxotrophie est due à une déficience de l'enzyme dihydroorotate déshydrogénase impliquée dans la voie de biosynthèse des pyrimidines. Cette voie nécessite le transfert des électrons au niveau de la membrane mitochondriale interne pour être active (Gregoire *et al.*, 1984). La croissance des cellules \square^0 est également dépendante de la présence de pyruvate dans le milieu. En effet, la réduction du pyruvate en lactate nécessaire à la régénération du NAD^+ , est importante pour la glycolyse. Pour ces raisons, la croissance des cellules \square^0 est souvent ralentie.

3.3.2.2 Potentiel de membrane mitochondrial des cellules \square^0

Du fait de l'absence de transporteur d'électron fonctionnel au niveau de la membrane mitochondriale interne, le transfert de protons de la matrice dans l'espace intermembranaire est également absent dans les cellules \square^0 . Cependant, une constatation surprenante, décrite initialement par Herzberg *et al.* (Herzberg *et al.*, 1993) et rapportée à de nombreuses reprises dans la littérature, est que l'importation de protéines mitochondriales est maintenue dans les cellules \square^0 alors que ce mécanisme nécessite l'existence d'un potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) (Daum *et al.*, 1982). Le potentiel doit donc être maintenu par d'autres mécanismes. Parmi ceux-ci, l'existence d'une ou plusieurs pompes électrogènes dans la MMI est envisageable. Une hypothèse proposée dans la littérature est que le maintien d'un potentiel de membrane résiduel impliquerait l'ANT de la MMI ainsi qu'une forme incomplète et dissociée de la Fo-F1 ATPsynthase (Buchet *et al.*, 1998). La partie F1 dissociée exercerait alors une activité ATPasique et fournirait ainsi de l' ADP^{3-} à l'ANT, qui assurerait ensuite l'échange avec de l' ATP^{4-} cytosolique formé par la glycolyse. Selon cette hypothèse, c'est

l'échange de l'ADP³⁻ matriciel contre de l'ATP⁴⁻ cytosolique par l'ANT qui est à l'origine de l'existence d'un potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial (figure 1.22). Le potentiel de membrane subsistant dans les cellules \square^0 est d'ailleurs sensible aux effets d'un inhibiteurs de l'ANT comme l'acide bongkréique ainsi qu'à l'azide ou l'aurovertine, inhibant la F₁ ATPase (Appleby *et al.*, 1999). Par contre, la sensibilité à l'oligomycine, qui inhibe la FO-F1 ATP synthase au niveau de la partie Fo, dépendante de la sous-unité 6 codée par le génome mitochondrial, disparaît dans les cellules \square^0 .

Au sujet de l'amplitude de ce potentiel de membrane, signalons qu'il varie en fonction des lignées cellulaires utilisées. Par exemple, dans les cellules HeLa \square^0 , il est du même ordre de grandeur que celui des cellules parentales, tandis que dans les 143B \square^0 , il est diminué de plus ou moins 80 % (Buchet *et al.*, 1998). Néanmoins, même avec des valeurs proches de 70 mV, le potentiel est suffisant pour permettre l'importation des protéines dans la mitochondrie (Appleby *et al.*, 1999). Une autre constatation est que ces lignées \square^0 ne sont également pas sensibles aux découplants comme le FCCP. Alors que le potentiel de membrane des cellules HeLa \square^0 est diminué en présence du FCCP, celui des 143B \square^0 y est moins sensible.

3.3.2.3 Cellules \square^0 et apoptose

La capacité ou non des cellules \square^0 de mourir par apoptose est également un sujet très étudié qui fournit des précisions intéressantes sur le rôle de la mitochondrie dans ce processus. La participation de la mitochondrie à l'apoptose avait d'ailleurs été mise en doute par Jacobson *et. al* (1993) qui avaient montré que les cellules \square^0 pouvaient mener à bien l'apoptose, suggérant ainsi qu'une mitochondrie fonctionnelle n'était pas nécessaire pour le mécanisme de l'apoptose (Jacobson *et al.*, 1993). Cependant, des cellules \square^0 conservent la capacité de relarguer le cytochrome c lors d'une dépolarisation membranaire (Jiang *et al.*, 1999). En fait, les cellules \square^0 ne déclenchent plus l'apoptose en réponse à tous les stimuli, ce qui met en évidence la complexité des voies menant à l'apoptose dépendante de la mitochondrie (Higuchi *et al.*, 1997).

3.3.2.4 Cellules β^0 et sécrétion

La sélectivité de réponses à différents stimuli a également été constatée dans des cellules □ des îlots de Langerhans déplétées en ADN mitochondrial (Tsuruzoe, *et al.*, 1998). L'augmentation en calcium cytosolique et la sécrétion d'insuline normalement déclenchée par le glucose dans les cellules □ ne sont pas observables dans les cellules β^0 . D'un autre côté, d'autres inducteurs comme l'arginine ou le glibenclamide vont entraîner une sécrétion normale d'insuline de la part des cellules β^0 (Tsuruzoe *et al.*, 1998). En sachant que certaines formes de diabètes sont dues à des altérations du génome mitochondrial, on comprend facilement l'intérêt que représente ce type d'étude.

3.3.2.5 Cellules β^0 et cycle du calcium

L'utilisation des cellules déplétées en ADN mitochondrial a permis l'étude de l'implication de la mitochondrie dans le cycle du calcium, ainsi que le rôle de cet ion en tant que messager intracellulaire. Il apparaît qu'un dysfonctionnement mitochondrial entraîne une réorganisation des flux calciques intracellulaires menant à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, comme le montrent Biswas *et al.* (2001) dans des cellules C2C12 β^0 . Ce phénomène est, en partie, dû à une diminution des efflux calciques au niveau de la membrane plasmique, résultant d'une moindre production d'ATP (Biswas *et al.*, 1999). Bien que le mécanisme ne soit pas connu, les mitochondries des cellules déplétées en ADNmt pourraient également participer à l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium. En effet, cette augmentation est corrélée à une diminution du stock de calcium intramitochondrial (Arnould *et al.*, 2002).

Cette modification de l'homéostasie calcique entraîne une modification de l'expression de certains gènes nucléaires dans les cellules β^0 comme par exemple, celui codant pour le récepteur à la ryanodine. Ce récepteur participe à la libération du calcium présent dans le réticulum endoplasmique, stimulée par le calcium. Cette variation d'expression génique passe par un changement d'activité de certains facteurs de transcription comme ATF2 et NFAT qui sont activés, et comme NF- κ B qui est inhibé (Biswas *et al.*, 1999). L'activité du facteur de transcription CREB est elle aussi modifiée par l'élévation cytosolique en calcium initiée par un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, comme démontré dans les cellules L929 déplétées en ADNmt, cette modification de l'homéostasie calcique entraîne l'activation de la CaMK IV, qui phosphorylera CREB sur la sérine 133. Dans ces cellules, l'activation de la

CaMK IV semble constitutive (Arnould *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que de nombreux gènes codants pour des protéines mitochondriales, telles que la MnSOD (Kim *et al.*, 1999), le cytochrome c (Gopalakrishnan *et al.*, 1994) et la carnitine palmitoyl transférase (CPT-1) possèdent au moins une séquence consensus CRE reconnue par CREB dans leur promoteur. Ajoutons encore que CREB et plus particulièrement sa forme phosphorylée peut induire une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 par une interaction protéine-protéine qui sera décrite au point 1.4.3.1.

3.3.2.6 Cellules \square^0 et hypoxie

Etant le site principal de consommation d'oxygène, la mitochondrie peut être considérée comme un senseur potentiel à l'oxygène. Ce senseur pourrait appartenir aux protéines possédant un groupement hème capable d'interagir avec l'oxygène. Au niveau moléculaire et cellulaire, de nombreuses stratégies adaptatives ont été développées par tous les organismes aérobies afin de se protéger contre la moindre disponibilité en O₂ (hypoxie). Par exemple, un facteur de transcription comme HIF1 (Hypoxia Inducible Factor) (Semenza, 1998; Semenza, 1999), activé en hypoxie permettra l'expression de nombreux gènes tels que l'erythropoïétine (EPO), le vaso-endothelial growth factor (VEGF) et des enzymes glycolytiques (Levy *et al.*, 1995) (Forsythe *et al.*, 1996). Les cellules \square^0 ont également été utilisées afin d'étudier l'implication de la mitochondrie dans l'expression de gènes de réponse à l'hypoxie (Chandel *et al.*, 1998). Il en ressort que dans des cellules \square^0 Hep3B incubées en hypoxie, on n'observe pas d'augmentation de liaison du facteur de transcription HIF1 à sa séquence consensus, ni de surexpression de l'EPO. Les résultats de nombreuses recherches ont permis de proposer l'hypothèse que l'hypoxie activerait la transcription de certains gènes via une voie de signalisation passant par la mitochondrie et qui impliquerait une production accrue de ROS (Chandel *et al.*, 1999) (Chandel *et al.*, 1998) (Kim *et al.*, 1998).

A partir des cellules \square^0 , d'autres modèles cellulaires, plus pertinents pour la physiopathologie liée à un dysfonctionnement mitochondrial, ont été développés afin d'étudier la contribution mitochondriale à la réponse cellulaire. Nous allons en dire quelques mots dans la suite de cette introduction.

3.3.3 Les cellules cybrides comme modèle d'études

La cellule cybride est une cellule obtenue par la fusion d'une cellule □^o avec une cellule énucléée (cytoplaste) ou anucléée (plaquette) (figure 1.23). Ces cellules offrent d'intéressantes possibilités d'étude, notamment en ce qui concerne les conséquences de mutations mitochondriales sur la réponse cellulaire (Sobreira *et al.*, 1999). Elles ont permis, en outre, de lier clairement certaines pathologies telles que les syndromes LHON (Jun *et al.*, 1994) et MERRF (Chomyn, 1998) à des dysfonctionnements mitochondriaux (Enriquez *et al.*, 1995) (Laderman *et al.*, 1996; Masucci *et al.*, 1995) (King *et al.*, 1989). En théorie, les mitochondries originaires des deux cellules peuvent interagir par transcomplémentation. Ce phénomène est cependant assez rare et lent (Enriquez *et al.*, 2000) (Takai *et al.*, 1999). Ces cellules ont néanmoins permis d'imaginer de nouvelles stratégies thérapeutiques, basées sur l'enrichissement de cellules de patients en ADNmt sauvage (Kagawa *et al.*, 2001) (Ito *et al.*, 1999).

3.4 La communication moléculaire rétrograde mitochondrie-noyau

Les cellules déplétées en ADN mitochondrial constituent donc un outil précieux pour l'étude des différentes réponses cellulaires impliquant la mitochondrie. Dans un contexte plus général, l'étude des relations moléculaires entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau a également bénéficié de cette approche. Ce concept de *communication rétrograde* entre la mitochondrie et le noyau, proposé par le groupe de Butow au Texas, a été établi dans des modèles de levures sur le fait qu'une modification de l'état d'activité de la mitochondrie induit une modification de l'expression de gènes (Parikh *et al.*, 1987) (Liao *et al.*, 1993). Pour renseigner le noyau sur son état d'activité, la mitochondrie doit, d'une manière ou d'une autre, générer des messagers secondaires qui pourront activer des facteurs de transcription et ainsi moduler l'expression de certains gènes. Parmi les candidats potentiels pouvant jouer ce rôle, on retrouve les ROS (Suzuki *et al.*, 1998) et les variations de concentrations en calcium cytosolique (Biswas *et al.*, 1999).

Différents facteurs de transcription ont déjà été impliqués dans la réponse nucléaire induite par un dysfonctionnement mitochondrial. Chez *S.Cerevisiae*, par exemple, les facteurs de transcription Rtg1p et Rtg3p transloquent du cytoplasme vers le noyau dans les cellules □^o

et permettent ainsi l'augmentation d'expression de gènes comme *CIT-2*, qui code pour la citrate synthase-2, une forme peroxysomale de l'enzyme impliquées dans les étapes précoces du cycle du glyoxylate (figure 1.24) (Sekito *et al.*, 2000). Chez les mammifères, les facteurs de transcription de la famille NRF (Nuclear Respiratory Factor) régulent l'expression des gènes participant à la respiration mitochondriale. Dans les cellules subissant un stress métabolique, l'ARNm codant pour NRF1 est plus abondant, et conduit à une augmentation d'expression des gènes placés sous son contrôle (Miranda *et al.*, 1999). Plus récemment, l'implication du facteur de transcription CREB dans la réponse cellulaire au stress mitochondrial a également été mise en évidence (Arnould *et al.*, 2002).

Véritable carrefour de nombreuses voies métaboliques au sein de la cellule, la mitochondrie émerge petit à petit comme un passage obligé dans de nombreuses études. Les nombreuses pathologies qui sont associées à ses dysfonctionnements en font désormais un centre d'intérêt pour de nombreuses recherches.

C'est dans le contexte de la communication moléculaire entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau, qu'une étude de RT-PCR differential display visant à identifier des gènes différentiellement exprimés dans des cellules présentant ou non une déplétion en ADN mitochondrial a été réalisée au laboratoire. Cette étude a permis de mettre en évidence la surexpression d'un gène codant pour un canal à chlore mitochondrial dans des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial. Cette observation a été le point de départ de ce mémoire.

La deuxième partie de cette introduction sera consacrée aux canaux à chlore, et plus spécifiquement à une classe particulière présentant une localisation intracellulaire. Après avoir passé en revue les différentes classes de canaux à chlore et les différentes fonctions qu'ils exercent, nous décrirons plus en détails les différents membres de la famille CLIC (Chloride Intracellular Channel) et plus particulièrement celui qui fait l'objet de nos recherches, mtCLIC.

3.5 Les canaux à chlore: diversité et ambiguïté

La structure moléculaire et les fonctions physiologiques des canaux à chlore ont été revues récemment (Jentsch *et al.*, 2002). Le chlore est l'anion le plus abondant du milieu extracellulaire et de nombreux canaux médient son passage par diffusion passive à travers les différentes membranes cellulaires. Le terme «canal à chlore» englobe en fait un grand

nombre de canaux qui diffèrent par leur conductance, leur sélectivité, leur structure et leur mode de régulation. En fait, leur classification, qui repose essentiellement sur leur structure moléculaire, est très complexe et la prudence est toujours de rigueur lorsqu'une nouvelle classe potentielle est découverte. En effet, le fait qu'une protéine a un effet sur la conductance au chlore ne signifie pas nécessairement qu'elle est un canal à chlore, car elle peut réguler ou favoriser par interaction protéine-protéine l'ouverture d'un canal à chlore sans être impliquée directement dans cette fonction. Actuellement, les auteurs s'accordent à dire qu'il existe trois classes de canaux à chlore établies de manière non ambiguë. Premièrement, les canaux dont l'ouverture est régulée par la liaison d'un ligand (comme les récepteurs à la glycine ou à l'acide γ -aminobutyrique GABA), ensuite le CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Riordan *et al.*, 1989) qui peut provoquer la mucoviscidose en cas de dysfonctionnement (Quinton, 1990), et enfin la famille des canaux à chlore CLC (Chloride Channel). Le schéma présenté à la figure 1.25 illustre la topologie de ces trois grandes classes de canaux à chlore. La famille des CLC, découverte il y a une dizaine d'années (Jentsch *et al.*, 1990), regroupe neuf membres identifiés à ce jour chez les mammifères. Ces différents membres se localisent soit en membrane plasmique, soit au niveau des différents organites intracellulaires. Ils se différencient des deux autres classes établies de canaux à chlore par leur structure homodimérique, où chaque sous-unité comporte un pore dont l'ouverture est en général régulée par une différence de potentiel (Fahlke *et al.*, 1997) (Dutzler *et al.*, 2002). L'étude des canaux CLC fait l'objet de nombreuses recherches (Jentsch *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Mindell *et al.*, 2001; Schmidt-Rose *et al.*, 1997; Schriever *et al.*, 1999) en raison des diverses pathologies qui sont liées à leur dysfonctionnement (Gunther *et al.*, 1998; Mohammad-Panah *et al.*, 2002; Schwake *et al.*, 2001).

3.5.1 Fonctions des canaux à chlore

Ces canaux sont impliqués dans de nombreuses activités cellulaires telles que la régulation du volume cellulaire, l'acidification de vésicules intracellulaires, le transport transépithélial et la régulation de l'excitabilité cellulaire. En fonction de leur distribution, les fonctions assurées par les canaux à chlore vont s'exercer au niveau de la membrane plasmique et des compartiments intracellulaires. Présent dans les membranes de différents organites tels que le lysosome ou le noyau, ils peuvent réguler le volume de cette organite ou bien modifier le transport électrogène de cations en dissipant ou en créant un gradient de charges de part et

d'autre de la membrane. On peut mentionner, par exemple, que le maintien d'un pH acide au sein du lysosome est un processus dépendant de la conductance au chlore (Tilly *et al.*, 1992). En effet, l'apport de protons mène rapidement à un déséquilibre de charges dans certains compartiments intracellulaires et l'import d'anion chlore qui s'en suit permet de contribuer à contrebalancer cet effet. Les canaux à chlore vont donc avoir notamment un rôle dans le bon fonctionnement de la voie endosomale. Une nouvelle classe de canaux à chlore à localisation intracellulaire va plus particulièrement nous intéresser dans le contexte de ce travail.

3.5.2 CLIC □ Une famille de canaux à chlore intracellulaire

La famille CLIC (ChLoride Intracellular Channel), constitue une classe de canaux à chlore encore mal connue (Heiss *et al.*, 1997). En effet, peu d'études sur l'électrophysiologie de ces canaux ont été réalisées. Le premier membre identifié, p64, fut découvert dans des cellules rénales bovines grâce à une chromatographie d'affinité réalisée avec l'inhibiteur de canaux à chlore IAA-94 (acide indanyloxyacétique) (Landry *et al.*, 1989). Différentes études biochimiques ont ensuite confirmé son activité de canal à chlore (Redhead *et al.*, 1992) (Edwards *et al.*, 1998). Depuis le clonage du gène codant pour p64 en 1993, d'autres protéines apparentées ont été identifiées, principalement sur base de leur homologie de séquence avec une partie du domaine carboxy-terminal de p64. Ce domaine carboxy-terminal d'environ 250 acides aminés est très conservé au sein de cette famille et leur confère notamment deux domaines transmembranaires potentiels. Une caractéristique étonnante de certains membres de cette famille est leur lente mobilité en gel SDS-PAGE. En effet, la protéine p64 possède en fait une masse de 48 kDa, mais doit son nom à la masse moléculaire apparente fournie par le gel. Cette caractéristique générale des canaux CLIC est peut être due à leur nature très acide (Nishizawa *et al.*, 2000).

Le premier homologue humain de p64, NCC27 (ou CLIC1 dans la nouvelle nomenclature) (Valenzuela *et al.*, 1997) est localisé principalement au niveau de la membrane nucléaire, mais on peut le retrouver également dans la membrane plasmique et dans le cytosol. Cette localisation cytosolique est assez surprenante pour un canal ionique. A l'heure actuelle, il est impossible de savoir si cette localisation cytosolique représente simplement une étape précoce de la synthèse de la protéine avant son adressage vers un compartiment subcellulaire, une étape intermédiaire dans la translocation de la protéine ou si la protéine y

exerce une fonction. Ces localisations multiples sont d'ailleurs assez communes parmi les membres de la famille CLIC. En ce qui concerne la protéine CLIC1, il a été démontré qu'elle pouvait générer un canal à chlore actif au sein d'une vésicule lipidique (Tulk *et al.*, 2000). CLIC1 est exprimée dans différents tissus de nombreuses espèces. Le gène codant pour CLIC1 est d'ailleurs très conservé. Bien que sa fonction soit encore peu connue, le lien entre l'activité de CLIC1 et le cycle cellulaire a été établie par Valenzuela *et al.* (2000). Ceux-ci émettent l'hypothèse que CLIC1 est impliquée dans la régulation des volumes cellulaires et nucléaires au cours de la mitose. Son inhibition par l'IAA-94 bloque en effet les cellules en phase G2/M (Valenzuela *et al.*, 2000). La protéine CLIC2, quant à elle, a également été identifiée sur base de son homologie avec p64 (Heiss *et al.*, 1997), mais aucune donnée fonctionnelle n'est encore disponible. Un autre membre à localisation nucléaire est la protéine CLIC3, identifiée dans un test double hybride comme partenaire de la protéine ERK7 (Extracellular Regulated Kinase) (Qian *et al.*, 1999), un membre atypique de la famille des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (Abe *et al.*, 2001). Sur base de cette association, Qian *et al.* ont d'ailleurs émis l'hypothèse que CLIC3 jouerait un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire. CLIC5 fut quant à elle identifiée en tant que partenaire de l'eitrine, une protéine impliquée dans les jonctions entre la membrane plasmique et le cytosquelette au niveau du syncytiotrophoblaste humain (Berryman *et al.*, 2000). Notons aussi qu'une protéine nommée parchorine, exprimée dans des cellules sécrétrices (Urushidani *et al.*, 1999), a également été incluse dans la famille des protéines CLIC (Nishizawa *et al.*, 2000) (Figure 1.26) L'hypothèse selon laquelle les protéines CLIC pourraient se complexer à et activer des protéines endogènes capable de former des canaux à chlore est également envisageable.

L'identification du tout premier homologue de p64 (p64H1) fut réalisée chez le rat (Edwards, 1999). Par la suite, l'orthologue humain, CLIC4 (Duncan *et al.*, 1997) et murin, mtCLIC (Fernandez-Salas *et al.*, 1999) furent également découverts. La localisation subcellulaire de CLIC4 varie au sein des nombreux types cellulaires et espèces étudiées. (Edwards, 1999) (Chuang *et al.*, 1999) (Duncan *et al.*, 1997). Dans le cadre de notre travail, nous nous intéressons plus particulièrement à l'orthologue murin de CLIC4, à savoir mtCLIC. Cette protéine présente une localisation mitochondriale (la première décrite pour une protéine CLIC) et cytosolique.

3.5.3 mtCLIC, un canal à chlore mitochondrial

Le gène codant pour la protéine mtCLIC a été identifié et cloné lors d'une étude portant sur l'expression différentielle de gènes dans des programmes de différenciation de kératinocytes issus de souris knock-out pour p53 (p53^{-/-}) et de souris wild type (p53^{+/+}) (Fernandez-Salas *et al.*, 1999). Dans cette étude, nous apprenons que mtCLIC semble régulée par p53 mais également par le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), une cytokine inflammatoire générant, entre autre, la production de radicaux libres par certains types cellulaires. De plus, la différenciation des kératinocytes est inductible par une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire et s'accompagne d'une surexpression du gène codant pour mtCLIC. On peut donc raisonnablement penser à une implication de ce cation bivalent dans la régulation de l'expression du gène codant pour mtCLIC.

Etant donné les rôles suspectés de p53 et du TNF α dans la régulation de l'expression du gène mtCLIC dans les kératinocytes, et comme ces deux molécules seront utilisées dans notre travail, nous allons brièvement les présenter.

3.5.3.1 p53, le gardien du génome

La protéine p53 est un facteur de transcription impliqué dans de multiples voies de signalisation régulant la différenciation cellulaire (Sabapathy *et al.*, 1997), l'inhibition de contact (Yahanda *et al.*, 1995), la sénescence (Serrano *et al.*, 1997) et la défense cellulaire (Graeber *et al.*, 1994) (Smith *et al.*, 1997). En effet, l'activation de ce "gardien du génome" peut, entre autre, induire un arrêt du cycle cellulaire, permettant la réparation de l'ADN avant sa réplication. En cas de dommages irréversibles, p53 peut alors induire la mort de la cellule par apoptose (Bates *et al.*, 1996). L'importance de cette protéine est d'ailleurs mise en évidence par le fait que sa mutation est observée dans la plupart des tumeurs, et que, dans le cas des maladies neurodégénératives, elle est surexprimée (Kitamura *et al.*, 1997).

En condition basale, la protéine p53 est très labile, et son activation passe en général au préalable par une augmentation de sa stabilité. Étant au centre d'une multitude de voies de signalisation, on comprend que sa régulation et ses modes d'activation doivent être extrêmement complexes et précis. De fait, la protéine p53 possède plusieurs sites de phosphorylation, principalement au niveau de ses domaines N et C-terminaux. Elle est également acétylable par différents co-activateurs (Colman *et al.*, 2000). L'activation

différentielle de p53 implique que chaque forme activée induise une réponse spécifique. Par exemple, selon les voies d'activation impliquées, p53 pourra entraîner soit la transcription du gène codant pour p21^{WAF} et provoquer ainsi l'arrêt du cycle cellulaire, soit la transcription du gène codant pour la protéine Bax, et mener dans ce cas à l'apoptose.

L'interaction de p53 avec d'autres facteurs de transcription a récemment été mise en évidence. En effet, l'activité transcriptionnelle de p53 dépend, entre autres, du recrutement d'un co-activateur nommé CBP (CREB Binding Protein). Ce co-activateur interagit également directement avec CREB phosphorylé. La nature de cette interaction entre p53, CREB et CBP a été décrite par Giebler *et al.* (Giebler *et al.*, 2000) et confirmée par la suite dans un autre modèle cellulaire (Arnould *et al.*, 2002). En fait, au lieu d'entrer en compétition pour ce co-activateur commun, les deux facteurs de transcription coopèrent pour donner lieu à une activité transcriptionnelle accrue de p53. C'est la formation d'un complexe ternaire contenant p53, CREB phosphorylé et CBP qui faciliterait l'activité transcriptionnelle de p53, CREB servant de pont moléculaire entre p53 et CBP (figure 1.27). Les multiples voies de signalisation dans lesquelles cette protéine est impliquée ainsi que ses nombreux modes d'activation font encore l'objet de multiples recherches (Blagosklonny, 2002) (Bargonetti *et al.*, 2002) (Michael *et al.*, 2002).

3.5.3.2 Le TNF□, une cytokine aux effets multiples

Un autre régulateur potentiel de mtCLIC est Le TNF □. Cette cytokine est produite principalement par les macrophages et les lymphocytes au cours d'une réaction inflammatoire (Vassalli, 1992). Le TNF□ donne lieu à de multiples réponses cellulaires, allant du déclenchement de l'apoptose à la prolifération cellulaire. Les différentes voies de signalisation activées ainsi que les diverses protéines impliquées en cas de contact avec le TNF□ ont récemment été revues (Baud *et al.*, 2001; MacEwan, 2002). La liaison du TNF□ sur l'un ou l'autre de ses deux récepteurs (TNFR1 et TNFR 2) peut entraîner notamment l'activation de la caspase 8, qui va déclencher la cascade d'activation menant à l'apoptose. Le TNF□ induit principalement l'activation de deux facteurs de transcriptions, AP1 et NF□B, qui ont un rôle dans la réponse inflammatoire de la cellule. Les diverses réponses cellulaires induites par le TNF□ sont reprises à la figure 1.28.

Aucune fonction biologique n'a encore été attribuée précisément à mtCLIC, néanmoins elle pourrait jouer un rôle dans le processus apoptotique médié par p53. En effet, sa surexpression induit l'apoptose dans des kératinocytes (Fernandez-Salas *et al.*, 2002)

Contexte de la recherche et objectifs de ce mémoire

Résumé des recherches antérieures à ce mémoire :

Un sujet de recherche portant sur la “communication moléculaire rétrograde” entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau a récemment été lancé au sein de l’URBC. Il vise à étudier les effets d’une inhibition de l’activité mitochondriale sur l’expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales ou non dans les cellules de mammifères. Nous recherchons également les effecteurs moléculaires (messagers secondaires, kinases...) capables de renseigner le noyau sur l’état d’activité de la mitochondrie.

Afin de rechercher les gènes différentiellement exprimés dans des cellules en condition de stress énergétiques, nous avons utilisé la technique de la «**RT-PCR differential display**». Cette étude de l’expression différentielle de gènes a été réalisée sur une lignée de cellules L929 issues d’un fibrosarcome murin et de L929 déplétées en ADN mitochondrial (L929dADNmt). Ces travaux, toujours en cours, nous ont cependant permis de visualiser environ 400 bandes d’intérêt potentiel correspondant à un certain nombre de gènes dont l’expression est induite ou augmentée dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial. Parmi ces 400 candidats potentiels, seul 120 fragments d’ADN ont été sous-clonés et identifiés par séquençage et recherche dans les banques de données. La première étude fonctionnelle sur un de ces candidats fait l’objet de ce travail.

Une liste des primers utilisés pour l’amplification des rétrotranscrits dans cette étude et un schéma récapitulatif reprenant les différentes étapes de l’approche «**RT-PCR differential display**» ayant conduit à l’identification de mtCLIC en tant que gène potentiellement surexprimé dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial sont respectivement présentés aux figures 1.29 et 1.30. Brièvement, l’ARN total des cellules L929 et L929dADNmt est extrait et rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc). Cet ADNc est ensuite amplifié par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant 15 amorces choisies arbitrairement et des nucléotides marqués radioactivement. Les produits d’amplification obtenus migrent ensuite dans un gel de polyacrylamide. Les bandes d’intérêt sont alors découpées et l’ADNc est purifié et amplifié par PCR. Après une migration dans un

gel d'agarose, l'ADNc est purifié et sous-cloné dans un vecteur p-GEM-T Easy, séquencé et identifié par une recherche en banque de données. Le fragment correspondant à mtCLIC a été amplifié avec les primers TVA et DDF2, sous-cloné, séquencé et l'alignement avec la séquence retrouvée dans la banque de données Blastn (NCBI) est présenté à la figure 1.31.

Avant le début de ce travail, la surexpression du candidat mtCLIC dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial a été confirmée par Northern blotting (donnée non montrée) ainsi que par un marquage en immunofluorescence et une visualisation en microscopie confocale. Les observations présentées à la figure 1. 32 montrent bien une surexpression de la protéine mtCLIC dans des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial également caractérisées par une faible expression de COX I, la sous-unité I de la cytochrome oxydase codée par le génome mitochondrial.

Au cours d'un travail précédent sur la recherche de voies de signalisation conduisant à modifier l'activité transcriptionnelle dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial, nous avons également montré au laboratoire que le facteur de transcription CREB, est phosphorylé constitutivement dans cette lignée de cellules déplétées en génome mitochondrial. Ce facteur est activé par la calcium/calmoduline kinase IV (CaMK IV) qui phosphoryle CREB sur la sérine-133. Une fois activé nous avons démontré que ce facteur interagit physiquement avec p53, et conduit à la transactivation de ce facteur. Ensemble, ces deux facteurs de transcription semblent participer au contrôle du cycle cellulaire en induisant la surexpression de la protéine p21^{Waf-1}, un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines. Cette hypothèse, qui pourrait rendre compte du cycle cellulaire plus long observé dans de nombreuses lignées de cellules déplétées en ADN mitochondrial, a été publiée récemment (Arnould *et al.*, 2002).

Objectifs de ce mémoire

Etant donné que la surexpression de mtCLIC pourrait provenir des effets non spécifiques liés à la présence du bromure dans le milieu et non être une réponse de la cellule à l'inhibition de l'activité mitochondriale, le premier objectif de ce mémoire a donc été de confirmer que l'activité de la mitochondrie, et plus particulièrement une inhibition de celle-ci, était bien responsable de la surexpression de mtCLIC. Pour y parvenir, nous avons utilisé une molécule découplante et deux inhibiteurs métaboliques de la mitochondrie bien décrits dans la littérature tels que le FCCP, l'antimycine A et l'oligomycine.

Nous avons ensuite recherché les mécanismes de régulation conduisant à la surexpression de cette protéine lors d'une inhibition de l'activité mitochondriale. Nous avons donc successivement étudié l'effet de molécules connues et décrites pour participer à la régulation de l'expression du gène codant pour cette protéine dans des kératinocytes (Fernandez-Salas *et al.*, 1999)

. Les molécules étudiées sur l'expression de mtCLIC sont la protéine p53, le TNF α et le calcium.

La fonction de la protéine mtCLIC dont le gène a été cloné très récemment est inconnue. Un autre objectif de ce travail était donc de rechercher l'effet éventuel de la surexpression de la protéine mtCLIC ou d'une inhibition de son expression sur une réponse mitochondriale. Etant donné l'intérêt suscité par le fait que les mitochondries de cellules déplétées en ADN mitochondrial sont toujours présentes et possèdent un potentiel de membrane, nous nous sommes intéressés au rôle que la protéine mtCLIC pourrait jouer dans le maintien du potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$).

Mentionnons enfin que nous avons également recherché l'abondance de la protéine CLIC4, l'orthologue humain de mtCLIC, dans d'autres modèles cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial tels que les cellules 143 B rho0 et les cellules cybrides MERRF présentant une mutation de l'ADN mitochondrial en position A 8344 G. Outre l'avantage de pouvoir confirmer les effets observés sur d'autres lignées cellulaires soumises à un stress énergétique, l'intérêt d'utiliser des cellules cybrides réside dans le fait que le dysfonctionnement mitochondrial présenté par ces cellules a une relevance pour la physiopathologie des maladies associées à ou induite par un dysfonctionnement mitochondrial.

Plasmides utilisés au cours de ce travail

Au cours des transfections de cellules réalisées tout au long de cette étude, nous avons utilisés différents plasmides, dont voici la liste

Un plasmide contenant le gène de la luciférase (pG13-luciférase). Ce gène est placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 13 séquences reconnues par le facteur de transcription p53. Ce plasmide nous a été fourni généreusement par le Dr. Bert Vogelstein (John Hopkins Oncology Center, Baltimore, USA)

Un plasmide codant la protéine p53 sauvage, ainsi qu'une construction autre codant pour une forme mutée de p53, p53(R175H). Ces deux plasmides nous ont également été fournis généreusement par le Dr. Bert Vogelstein.

Un plasmide codant pour un dominant négatif de CREB (Arg287Leu, K-CREB). Cette construction nous a été gracieusement donnée par le Prof. E. Greenberg (Children's Hospital, Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, USA)

Un plasmide codant pour la β -galactosidase. Ce gène, placé sous le contrôle d'un promoteur fort (CMV) et utilisé pour normaliser les valeurs obtenues lors des transfections réalisées avec le gène rapporteur pG13-luciférase. Il nous a été fourni par le Prof. C. Cepko (Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA)

Un plasmide codant pour la protéine mtCLIC, une construction codant pour la protéine de fusion mtCLIC-GFP et un plasmide codant pour la GFP et servant ce contrôle de transfection. Ces plasmides nous ont été généreusement fournis par le Dr. Fernandez-Salas (National Institute of Health, Maryland, USA)

Un vecteur pGL2 est également utilisé comme contrôle de transfection.

Ces différentes constructions ont été amplifiées dans la souche bactérienne *E. coli SURE* (Stratagene, USA), dont les membranes sont perméabilisées au CaCl_2 (bactéries « CaCl_2 -compétentes») avant la transformation par choc thermique. La purification des constructions amplifiées permet de récupérer les plasmides qui, après mesure de leur concentration au photomètre (Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne), seront utilisés dans les expériences de transfection.

4 MATERIEL ET METHODES

4.1 CULTURE CELLULAIRE ET SOUS-CULTURES

4.1.1 Matériel

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées au cours de ce travail (Figure 2.1). Pour chaque lignée, nous disposons de cellules sauvages et de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial.

Les cellules L929 sont des cellules issues d'un fibrosarcome murin. Ces cellules nous ont été fournies par le professeur J.Grooten de l'université de Gand. Une population non clonale de L929 déplétée en ADN mitochondrial est également utilisée. Ces cellules sont cultivées en présence de bromure d'éthidium (400 ng/ml). Elles ont été caractérisées pour leur abondance en ADN mitochondrial, leur charge en ATP, leur respiration et l'expression de la sous-unité I de la cytochrome oxydase, codée par l'ADN mitochondrial (Arnould *et al.*, 2002). Les cellules 143B proviennent d'un ostéosarcome humain. Une lignée clonale de cellules 143B⁰, complètement déplétée en ADN mitochondrial est aussi à notre disposition. Nous possédons également deux lignées de cellules cybrides issues de cellules 143B⁰. L'obtention des cellules cybrides est décrite au point 1.3.3 de l'introduction. Les cellules cybrides 143B⁰ utilisées ici possèdent soit des mitochondries de personnes saines, soit des mitochondries possédant dans leur génome la mutation ponctuelle A8344G, responsable du phénotype MERRF. Nous les appellerons respectivement MERRF sauvages et MERRF mutées. Ces quatre lignées cellulaires nous ont été généreusement données par le professeur G.Attardi (California Institute of Technology, CIT, USA) et ont été caractérisées précédemment (King *et al.*, 1989).

Type sauvage	Type présentant un dysfonctionnement mitochondrial.
L929 (fibrosarcome murin)	L929 déplétées en ADN mitochondrial.(population non clonale)
143B (ostéosarcome humain)	143B rho0 (population clonale)
Cellules cybrides (issues de 143B rho0) possédant des mitochondries de personnes saines.	Cellules cybrides possédant des mitochondries présentant la mutation ponctuelle A8344G.

Les cellules sont maintenues en culture dans des boîtes de cultures de 75 cm² (Costar, USA) contenant 15 ml de milieu DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose □ 4,5 g/ litre) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco BRL, Grande-Bretagne). Les cellules sont maintenues dans une atmosphère comprenant 5 % de CO₂ et 95 % d'air humide dans une étuve à 37°C (Heraeus, Allemagne). Les différentes lignées cellulaires disponibles sont sous-cultivées 2 fois par semaine selon le protocole décrit ci-dessous.

4.1.2 Sous-cultures

Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline □ 0,9 % NaCl, 10 mM KH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7,4) préchauffé à 37°C. Ce rinçage permet d'éliminer les résidus de sérum contenant des inhibiteurs de protéases. On ajoute ensuite 1ml de trypsine (0,5 g/l dans une solution de Puck) afin de digérer les composants de la matrice extracellulaire et de détacher les cellules. L'avancement de la trypsinisation est suivi au microscope à contraste de phase. Les cellules détachées sont ensuite reprises dans un volume déterminé de DHG contenant 10 % de sérum, lequel inactive la trypsine. Un comptage cellulaire peut être effectué sur la suspension cellulaire à l'aide d'une chambre de Neubauer (Marienfeld, Allemagne). La culture cellulaire est maintenue en assurant les sous-cultures deux fois par semaine. Etant donné que les cellules qui présentent un dysfonctionnement mitochondrial ont une croissance ralentie, les dilutions de repiquages sont adaptées en fonction du type cellulaire. Pour les L929 et les L929 déplétées en ADN mitochondrial, les dilutions sont respectivement de 1 □ 8 et 1 □ 5. Les 143B et les MERRF sauvages sont repiquées à une dilution de 1 □ 5 tandis que les 143B □⁰ et les MERRF mutées

sont ensemencées à une dilution 1/3. De par leur auxotrophie pour l'uridine, on ajoute 50 µg / ml d'uridine au milieu de culture, qui contient 0.11 g/l de pyruvate.

4.2 WESTERN BLOTTING

La technique du Western blotting a été utilisée afin d'estimer l'abondance de la protéine mtCLIC dans les différents types cellulaires utilisés, et également de p53 dans les cellules L929 et L929dADNmt. Dans certaines conditions, les cellules seront traitées ou non avec des inhibiteurs métaboliques de l'activité mitochondriale tels que l'Oligomycine et l'Antimycine A ou un agent découplant comme le FCCP. Elles seront également incubées ou non en présence d'ionomycine, de BAPTA-AM ou d'une cytokine telle que le TNFα.

4.2.1 Principe

Les cellules sont récupérées dans un tampon de lyse afin de préparer des lysats clairs. Les échantillons sont ensuite chargés dans un gel de polyacrylamide de pourcentage déterminé et soumis à une différence de potentiel pour permettre la migration des protéines dans le gel. La séparation s'effectue en une dimension selon le poids moléculaire des protéines. Celui-ci sera estimé pour la protéine d'intérêt par comparaison avec un étalon de poids moléculaire constitué d'un ensemble de protéines de poids moléculaire connu. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène fluoride). La membrane est ensuite mise à bloquer dans une solution de lait afin d'éviter les liaisons non spécifiques des anticorps utilisés par la suite. La protéine d'intérêt est alors détectée à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre l'un de ses épitopes. La fixation de l'anticorps primaire est proportionnelle à l'abondance de la protéine d'intérêt. Dans un deuxième temps, un anticorps secondaire reconnaissant les fragments Fc de l'anticorps primaire est ajouté. Cet anticorps est couplé à une peroxydase issue du raifort (HRP=Horse Radish Peroxidase). La révélation est réalisée en présence d'un substrat de l'enzyme et de luminol. L'émission de photons, produits au cours de cette réaction, est utilisée pour imprimer un film autoradiographique. Dans la zone de linéarité d'exposition avant saturation, le signal est proportionnel à la quantité d'antigène présent, et donc à l'abondance de la protéine d'intérêt.

4.2.2 Méthodes

4.2.2.1 Abondance de la protéine CLIC4 dans les cellules 143B, 143B Δ , MERRF sauvages et mutées, et de la protéine mtCLIC dans des cellules L929 et L929dADNmt

Les cellules L929, L929dADNmt, 143B, 143B Δ , MERRF sauvages et mutées sont cultivées dans des boîtes de 75 cm² et lysées trois jours plus tard.

4.2.2.2 Effet de différents inhibiteurs de l'activité mitochondriale sur l'abondance des protéines mtCLIC et p53 dans des cellules L929

Les cellules L929 sont sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² deux jours avant les incubations. Elles sont ensuite incubées ou non pendant 6 h dans du DHG en présence d'oligomycine (8 μ M), d'antimycine A (1 μ M) ou de FCCP (10 μ M). Au terme des incubations, le milieu de culture est enlevé et remplacé par du DHG + 10 % FBS. Les cellules récupèrent pendant 18 h avant d'être lysées.

4.2.2.3 Effet du TNF α sur l'abondance de mtCLIC dans des cellules L929

Les cellules L929 sont sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² deux jours avant les incubations. Elles sont ensuite incubées ou non pendant 14 h en présence de TNF α à 0,25, 1, 2,5, 10, 40 ou 80 ng/ml. Les cellules sont lysées au terme des incubations.

4.2.2.4 Effet de l'ionomycine sur l'abondance de la protéine mtCLIC dans des cellules L929 et L929dADNmt

Les cellules L929 et L929dADNmt sont sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² deux jours avant les incubations. Elles sont ensuite incubées pendant 14 h dans du DHG en présence d'ionomycine à 0.01, 0.1 ou 1 μ M. La lyse cellulaire est réalisée au terme des incubations.

4.2.2.5 Effet du BAPTA-AM sur l'abondance de mtCLIC dans des cellules L929 et L929dADNmt

Les cellules L929 et L929dADNmt sont sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² deux jours avant les incubations. Elles sont ensuite incubées pendant 14 h dans du DHG en présence de BAPTA-AM à 1, 5, 10 ou 20 μ M. La lyse cellulaire est réalisée au terme des incubations.

4.2.3 Préparation des lysats cellulaires

Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées 2 fois avec 5 ml ou 10 ml de PBS à 4°C pour respectivement les boîtes de 25 et de 75 cm². Elles sont ensuite récoltées dans 750 μ l (pour les boîtes de 75 cm²) ou 300 μ l (pour les boîtes de 25 cm²) de tampon de lyse (40 mM Tris-pH 7,5; 300 mM KCl; 2 mM EDTA et 1 % triton X-100). Ce tampon de lyse contient également des inhibiteurs de protéases en tablettes (Roche, Allemagne). Les lysats ainsi obtenus sont maintenus 30 min sur glace, puis centrifugés 15 min à 15000 rpm (4°C) afin de sédimenter le matériel insoluble dans le tampon de lyse. Un dosage des protéines est ensuite réalisé sur le lysat clair (= surnageant).

4.2.4 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

On prélève 1 μ l du lysat clair de l'échantillon obtenu après lyse cellulaire que l'on ajoute à 1 ml de réactif Bradford (Bradford, 1976) (BioRad, Allemagne) dilué 5 fois dans de l'eau distillée et filtré. On vortexe ensuite 10 s, et après 5 min de réaction, la densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. La concentration en protéines peut être calculée grâce à un étalon BSA (Bovine Serum Albumin) de concentration connue (5 μ g / μ l) selon la formule suivante :

$$[\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \left[\frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{blanc}}}{\text{DO}_{\text{étalon}} - \text{DO}_{\text{blanc}}} \right] \times 5$$

4.2.5 Préparation des échantillons pour le Western blotting

Un volume de lysat cellulaire correspondant à la quantité de protéines désirée (15, 20, 25 ou 50 μ g) est prélevé et porté à 40 μ l avec du tampon de lyse. On ajoute ensuite 10 μ l de Laemmli sample buffer 5X (Laemmli, 1970), dont la composition est \square 0,5 M Tris, pH 6,8, 20 % SDS, 20 % glycérol, 1% bleu de bromophénol, 20 % bromo-mercaptoéthanol. Les échantillons sont alors portés à 100° C pendant 5 min pour assurer leur dénaturation. Ils sont ensuite centrifugés pendant 30 s à 13000 rpm et chargés dans les puits du gel.

Dans un des puits, on ajoute 10 μ l d'étalon de poids moléculaire SeeBlue Plus2 (Invitrogen, USA).

4.2.6 Composition des gels et migration

La migration des échantillons s'effectue successivement dans deux gels de composition différente. Le premier concentre les protéines tandis que le second permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire.

Gel de concentration ou « stacking gel » 4.5 %

- 1,1 ml d'une solution de polyacrylamide 40 % (Pharmacia Biotech, Suède) et de bisacrylamide 0,8 % (Pharmacia Biotech, Suède)
- 3,9 ml d'eau distillée
- 5 ml de tampon B (pour 500 ml \square 121 ml Tris-HCl 2M; pH 6,8 \square 4 ml Tris-base 2M; 10 ml SDS 20 % et 365 ml H₂O)
- 40 μ l d'APS (ammonium persulfate, Pharmacia Biotech, Suède) 25%
- 15 μ l de TEMED (TEtraMethylEthyleneDiamine, Pharmacia Biotech, Suède)

Gel de séparation ou running gel 10%

- 11,25 ml d'une solution de polyacrylamide 40 % (Pharmacia Biotech, Suède) et de bisacrylamide 0,8 % (Pharmacia Biotech, Suède)
- 11,25 ml d'eau distillée
- 22,5 ml de tampon A (pour 500 ml 90ml Tris-HCl 2M; pH 8,8 285 ml Tris-Base 2M; 10 ml SDS 20 % et 115 ml H₂O)
- 200 μ l d'APS 25%
- 75l TEMED

Le pourcentage d'acrylamide nécessaire pour le gel de séparation est déterminé en fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Le pourcentage choisi sera d'autant plus élevé que le poids moléculaire de la protéine d'intérêt est faible.

Les différents gels sont coulés dans un montage entre deux plaques de verre. La polymérisation s'effectue pendant 45 min pour chacun des gels. L'insertion d'un peigne pendant la polymérisation du gel de concentration permet de former les puits utilisés pour charger les échantillons.

La migration s'effectue dans un tampon de migration de composition: 0,05 M Tris-base 0,38 M glycine et 0,1% SDS. Les échantillons migrent dans le gel de concentration pendant 45 min avec un courant de 35 mA, et ensuite dans le gel de séparation pendant 6 h avec un courant d'intensité de 45 mA.

Nous avons également utilisé des "mini gels" précoulés NuPAGE 4-12 % (Invitrogen, USA), Dans ce cas, le tampon de migration est fourni (Running buffer 1X, Invitrogen, USA) et il faut ajouter des antioxydant (0.25 %) (Invitrogen, USA). Pour ces gels, la migration s'effectue pendant 50 min dans un courant générant une différence de potentiel constante de 200 V.

4.2.7 Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et un montage en «sandwich» est réalisé dans un appareil de transfert «Semi-dry». Ce type de montage est représenté à la figure 2.2. Le «sandwich» est placé entre deux électrodes et baigné dans un tampon de

transfert de composition 0,5 M Tris-base pH 8,3, 0,76 M glycine, 0,1 % SDS et 15 % méthanol. Un courant de 35 mA est ensuite appliqué pendant 16 h. Pour les gels NuPAGE 4-12 %, le transfert s'effectue pendant 2 h dans une cuve fournie par Invitrogen (Novex Mini-Cell) avec un courant générant une différence de potentiel de 30 V. Le tampon de transfert (Transfert buffer, Invitrogen, USA) contient 20 % de méthanol (Acros organics, Belgique) et 0,1 % d'antioxydants.

4.2.8 Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation.

Afin d'éviter la liaison non spécifique des anticorps sur la membrane, celle-ci est tout d'abord mise à bloquer dans du TBS-T contenant 5% de lait gloria (Nestlé, Belgique). La composition du TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween) est de 2,4 g / l Tris-HCl pH 7,4; 8 g/l NaCl et 0,1 % Tween 20 (Sigma Chemical, USA).

Pour détecter la protéine mtCLIC ou CLIC4, nous disposons de deux anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre le domaine C-terminal ou N-terminal de la protéine. Ils seront appelés respectivement anticorps 129 et 122 dans la suite de ce travail. Ces deux anticorps ne sont pas disponibles commercialement et nous ont été généreusement fournis par l'équipe du professeur Yuspa (NIH, USA). Les deux anticorps sont dilués dans le TBS-T 5 % gloria à une dilution de 1/2000 et 1/4000 pour, respectivement, les anticorps 122 et 129. La détection de la protéine p53 a été recherchée en présence d'un anticorps monoclonal de souris (Oncogen, USA) dilué à 1 µg / ml dans du TBS-T 5 % gloria. Pour chaque Western blot, on procède à un contrôle de charge. Nous utilisons alors un anticorps dirigé contre l'α-tubuline ou contre la TBP (TATA box Binding Protein), deux protéines dont l'abondance ne varie pas dans nos conditions expérimentales. Les anticorps de souris anti-α-tubuline (Inogenex, USA) et de lapin anti-TBP (Santa Cruz, USA) sont dilués respectivement 3000 et 200 fois dans du TBS-T 5% gloria.

Après une incubation de 2 h à température ambiante avec l'anticorps primaire, la membrane est rincée 3 fois 5 min avec du TBS-T 5% gloria. L'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris, dilué 2000 fois dans du TBS-T 5% gloria et couplé à la peroxidase, est ensuite ajouté pendant 45 min. La membrane est finalement rincée 3 fois 20 min avec du TBS-T. La révélation est réalisée par une incubation de 5 min en présence d'ECL (Enhanced

ChemiLuminescence) (figure 2.3) et un film autoradiographique (Hyperfilm, Amersham Grande-Bretagne) est alors exposé sur la membrane. Le film est ensuite révélé, rincé et fixé par des bains successifs dans une solutions de révélation (ILFORD imaging, Grande Bretagne), de l'eau et une solution de fixation (ILFORD imaging, Grande Bretagne). Après séchage, le film est scanné.

4.3 MESURE DE LA CYTOTOXICITE

Afin de quantifier la cytotoxicité du TNF α pour les cellules L929 et L929dADNmt, nous avons utilisé un test basé sur la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) par les cellules.

4.3.1 Principe du dosage de l'activité LDH

La mortalité cellulaire peut être quantifiée en mesurant l'activité d'enzymes relarguées par la cellule endommagée et dont la perméabilité membranaire est augmentée. L'activité enzymatique mesurée dans le milieu est donc directement proportionnelle à la mortalité cellulaire par cytolysse. Parmi ces enzymes, la LDH est une enzyme cytosolique stable et présente dans toutes les cellules.

Le dosage de l'activité LDH est réalisé au moyen du *Cytotoxicity detection Kit* (Roche, Allemagne) selon le principe suivant: après l'incubation des cellules avec la substance à tester, un aliquot du milieu de culture est prélevé et incubé en présence de la mixture réactionnelle. Cette mixture est fournie dans le kit et est préparée selon les instructions données par le manuel. La réaction enzymatique se passe en deux étapes. Dans un premier temps, la LDH du milieu catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate, ce qui permet la formation de NADH+H⁺. Ensuite, les électrons du NADH sont transférés par la diaphorase sur un substrat chromogène, le sel de tetrazolium. Le sel réduit qui en résulte (formazan) présente un pic d'absorbance à 490 nm. Cette réaction est schématisée à la figure 2.4.

4.3.2 Méthode

Les cellules sont repiquées deux jours avant le test dans du DHG + 10 % FBS à une densité de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits (Costar, USA). Les cellules sont ensuite incubées pendant 14 h dans du DHG sans sérum en présence ou non de TNF α à 0,25, 1, 2,5, 10, 40 et 80 ng / ml. Au terme de ces incubations, le milieu de culture est récupéré sur glace (4°C) et centrifugé 2 min à 13000 rpm (Biofuge pico, Heraeus Allemagne) afin de sédimenter les cellules éventuellement détachées. Ensuite on mélange 100 μ l du surnageant des échantillons à 100 μ l de mixture réactionnelle dans une boîte 96 puits (Costar, USA) et on incube pendant 30 min à l'obscurité. Au terme de cette incubation, on mesure l'absorbance au spectrophotomètre à 490 nm (Ultramark, Biorad, Allemagne). Les cellules détachées et maintenant présentes dans le culot sont des cellules mortes dont la perméabilité membranaire est éventuellement intacte. Elles doivent donc être prise en compte pour déterminer la cytotoxicité. Le culot est resuspendu et lysé à l'aide de 100 μ l d'une solution de DHG contenant 2% de triton X-100 (Merck, Allemagne). On mélange ensuite 100 μ l de la solution obtenue à 100 μ l de mixture réactionnelle. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, on mesure également l'absorbance au spectrophotomètre à 490 nm.

La mesure de la cytotoxicité nécessite des contrôles adéquats: le *background control* correspond au blanc, c'est à dire l'activité LDH présente dans le milieu de culture sans cellules. Cette valeur sera soustraite de toutes les autres. Le *low control* représente l'activité de la LDH dosée dans le milieu et libérée par des cellules non traitées. Le *High control* est l'activité LDH dosée dans le milieu lorsque toutes les cellules ont été lysées par du triton X-100 2 %.

L'équation suivante permet de calculer le pourcentage de cytotoxicité

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Valeur test} - \text{low control}}{\text{High control} - \text{low control}} \times 100$$

4.4 TRANSFECTION

La transfection est une technique qui consiste à faire incorporer de l'ADN exogène à une cellule eucaryote. La transfection a été utilisée dans le cadre de ce travail afin de mesurer l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 au moyen d'un système rapporteur luciférase.

Elle a également été utilisée afin de surexprimer la protéine p53 sauvage, ainsi que la protéine mtCLIC, fusionnée ou non à la GFP (Green Fluorescent Protein) en 3'. Des constructions codant pour des dominants négatifs de p53 (p53(R175H)) et du facteur de transcription CREB (K-CREB) ont également été utilisés pour diminuer l'activité transcriptionnelle de p53. Les différentes constructions utilisées au cours de ce mémoire sont décrites à la page 35.

4.4.1 Technique et outils

Il existe de nombreuses techniques permettant de réaliser des transfections. Nous utilisons le Superfect (Qiagen, Allemagne). En effet, les conditions ont été optimisées au laboratoire sur les cellules L929 en utilisant ce système. A la figure 2.5, on peut visualiser le taux de transfection des L929 par le Superfect. Les cellules L929 ont été ou non transfectées avec 1 μ g d'un plasmide codant pour la β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur CMV en utilisant le Superfect dans un rapport 1 \square 5. L'efficacité de transfection est révélée 48 h après transfection par une coloration utilisant le kit « β -gal staining set» (Roche, Allemagne). Ces résultats montrent qu'en utilisant ce système il est possible d'obtenir un taux de transfection de 40 à 60 % dans ces conditions.

4.4.1.1 Principe du système superfect

L'agent Superfect est un dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique. Sa structure lui permet de se lier et de complexer l'ADN en structures compactes qui faciliteront son entrée dans la cellule. Le complexe Superfect-ADN possède une charge nette positive, ce qui lui permet de se lier à des glycoprotéines chargées négativement situés en surface des cellules eucaryotes. Une fois à l'intérieur, l'agent Superfect tamponne l'acidité du lysosome après sa fusion avec l'endosome, ce qui favorise la stabilité de l'ADN dans la cellule transfectée.

4.4.2 Méthode

Les cellules destinées à la transfection sontensemencées dans des boîtes de 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits, ou dans des boîtes de 25 cm² à la dilution 1 \square 30. Les quantités totales d'ADN utilisées sont de 1,5 μ g par puit et de 5 μ g par boîte. Par puit ou par

boîte, on ajoute respectivement l'ADN dans 75 μ l et 100 μ l de milieu sans sérum pour permettre la formation des complexes Superfect-ADN. On ajoute ensuite le Superfect dans un rapport 1:5 (5 μ l de superfect par μ g d'ADN). La mixture est vortexée 10 s et laissée à température ambiante pendant 15 min. On ajoute ensuite du milieu avec sérum et on dispense 450 μ l par puits ou 5 ml par boîte avant de les remettre à l'étuve pour 6 h (figure 2.6).

4.4.2.1 Surexpression des protéines p53 et mtCLIC dans des cellules L929

Les cellules L929, sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² à la dilution 1 \times 30, sont transfectées transitoirement pendant 6 h avec 5 μ g de plasmide codant pour la GFP (contrôle), ou pour p53 ou pour mtCLIC. Après 6 h d'incubation, le milieu de culture est enlevé et les cellules récupèrent pendant 14 h dans du DHG + 10 % FBS. Au terme de cette récupération, les cellules sont lysées avec un tampon contenant 1 % de triton X-100 et un Western blot est réalisé suivant le protocole décrit au point 2.2.

4.4.2.2 Surexpression des dominants négatifs p53(R175H) et K-CREB dans des cellules L929dADNmt

Les cellules, sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² sont transfectées ou co-transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec 5 μ g de plasmide codant pour la GFP, K-CREB ou p53(R175H) ou 2,5 μ g de chacun des deux derniers plasmides. Le milieu de transfection est ensuite remplacé et les cellules récupèrent 18 h dans 5 ml de DHG + 10 % FBS. Au terme de cette récupération, les cellules sont lysées avec un tampon contenant 1 % de triton X-100 et un Western blot est réalisé suivant le protocole décrit au point 2.2.

4.4.2.3 Surexpression des dominants négatifs p53(R175H) et K-CREB dans des cellules L929

Les cellules L929, sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² à la dilution 1 \times 30, sont transfectées transitoirement pendant 6 h avec 5 μ g de plasmide codant soit pour la GFP (contrôle) soit pour p53(R175H) ou K-CREB. Après 6 h d'incubation, les cellules récupèrent 18 h dans du DHG + 10 % FBS avant d'être incubées pendant 6 h en présence d'antimycine A (1 μ M) ou de FCCP (10 μ M). Au terme de cette incubation, le milieu de culture est prélevé et les cellules récupèrent 18 h avant d'être lysées. Dans une autre condition, les cellules

recupèrent de la transfection pendant 24 h dans du DHG + 10 % FBS avant d'être incubées 14 h en présence de TNF α à 10 ng/ml. Au terme de l'incubation, les cellules sont lysées. Un Western blot est réalisé à partir des lysats clairs suivant le protocole décrit au point 2.2.

4.4.2.4 Le système rapporteur luciférase pour p53 (pG13-luc)

Afin de mettre en évidence et de quantifier l'activité transcriptionnelle dépendante de p53, nous utilisons un plasmide rapporteur pG13 codant pour le gène de la luciférase. Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 13 séquences reconnues par p53 (5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GpyPyPy-3'). Le gène de la luciférase va être exprimé en fonction de l'activité transcriptionnelle dépendante du facteur de transcription étudié, en l'occurrence p53.

Afin de normaliser les résultats de la transfection du système rapporteur, les cellules sont co-transfectées avec un plasmide codant pour le gène de la β -galactosidase. Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur viral fort (CMV) et sera donc exprimé constitutivement dans les cellules transfectées. L'expression de la β -galactosidase est donc fonction de l'efficacité de transfection, mais est indépendante de la condition expérimentale.

4.4.2.5 Effet de la surexpression de p53 sur l'activité transcriptionnelle de p53 dans des cellules L929

Les cellules L929, sous-cultivées dans une boîte 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits, sont co-transfectées transitoirement pendant 6 h avec 0,25 μ g de plasmide pG13-luc, de plasmide codant pour la β -galactosidase et d'une construction codant pour la protéine p53. Les cellules contrôle sont co-transfectées avec 0,25 μ g de vecteur pGL2. Après 6 h d'incubation, le milieu de culture est enlevé et les cellules récupèrent pendant 18 h dans du DHG + 10 % FBS. Les activités luciférase et β -galactosidase sont dosées au terme de cette récupération.

4.4.2.6 Effet de l'antimycine A, de l'oligomycine et du TNF α sur l'activité transcriptionnelle de p53 dans des cellules L929 et L929dADNmt

Les cellules L929 et L929dADNmt, sous-cultivées dans des boîtes 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits, sont co-transfectées transitoirement pendant 6 h au

Superfect avec 0,25 μ g de plasmide pG13-luc et de plasmide codant pour la β -galactosidase. Après 6 h d'incubation, le milieu de culture est enlevé et les cellules récupèrent pendant 18 h dans du DHG + 10 % FBS. Au terme de cette récupération, les cellules sont incubées ou non (contrôle) pendant 6 h en présence d'oligomycine (8 μ M), d'antimycine A (1 μ M) ou de TNF α (20 ng/ml). Les activités luciférase et β -galactosidase sont dosées au terme des incubations.

4.4.2.7 Effet du TNF α en faible concentration sur l'activité transcriptionnelle de p53 dans des cellules L929 et L929dADNmt

Les cellules L929 et L929dADNmt, sous-cultivées dans des boîtes 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits, sont co-transfectées transitoirement pendant 6 h avec 0,25 μ g de plasmide pG13-luc et de plasmide codant pour la β -galactosidase. Après 6 h d'incubation, le milieu de culture est enlevé et les cellules récupèrent pendant 18 h dans du DHG + 10 % FBS. Au terme de cette récupération, les cellules sont incubées ou non pendant 6 h en présence de concentrations croissantes en TNF α , allant de 0,1 à 2,5 ng/ml. Les activités luciférase et β -galactosidase sont dosées au terme des incubations.

4.4.2.8 Effet de la surexpression de p53(R175H) et de K-CREB sur l'activité transcriptionnelle de p53 dans des cellules L929 et L929dADNmt

Les cellules L929 et L929dADNmt, sous-cultivées dans des boîtes 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits, sont co-transfectées transitoirement au Superfect pendant 6 h avec 0,25 μ g de plasmide pG13-luc et de plasmide codant pour la β -galactosidase. Elles sont également transfectées selon les conditions avec 0,5 μ g de plasmide codant pour p53(R175H) ou K-CREB. Dans une condition, les cellules sont co-transfectées avec 0,25 μ g de plasmide codant pour p53(R175H) et K-CREB. Les cellules contrôles sont transfectées avec les mêmes quantités d'ADN pour le rapporteur pG13-luc et la β -galactosidase, et avec 0,5 μ g de vecteur pGL2. Après 6 h d'incubation, le milieu de culture est enlevé et les cellules récupèrent pendant 18 h dans du DHG + 10 % FBS. Les activités luciférase et β -galactosidase sont dosées au terme de cette récupération.

4.4.2.9 Effet de la surexpression de p53(R175H) sur l'activité transcriptionnelle de p53 dans des cellules L929 surexprimant p53

Les cellules L929,ensemencées à raison de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 12 puits, sont co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec le plasmide rapporteur pG13-luc (0,25 μ g), le plasmide codant pour la β -galactosidase (0,25 μ g) et 0,75 μ g d'un vecteur pGL2 (contrôle) ou de plasmide codant pour p53 sauvage. Selon les conditions, elles seront également transfectées avec des quantités croissantes de plasmide codant pour p53(R175H). Les dosages des activités luciférase et β -galactosidase est réalisé après 18 h de récupération dans du DHG + 10 % FBS.

4.4.3 Dosage de l'activité luciférase

4.4.3.1 Principe

L'activité luciférase est dosée a l'aide du kit *luciferase reporter assay* (Promega USA). En présence d'ATP et d'O₂, la luciférase peut oxyder la luciférine. Un des intermédiaires obtenu se fait ensuite oxyder en oxyluciférine et libère alors des photons (figure 2.7). L'émission de lumière est quantifiable grâce a un bioluminomètre (Biocounter M2010, Lumac Pays-Bas).

4.4.3.2 Lyse cellulaire

Les cellules sont rincées une fois avec 1 ml de PBS et lysées dans 150 μ l de tampon de lyse (Passive lysis buffer, Promega USA). La boîte de 12 puits est ensuite agitée pendant 15 min à température ambiante. Le lysat obtenu est récupéré dans un eppendorf et centrifugé 3 min à 13.000 rpm. Les dosages seront effectués sur les surnageants.

4.4.3.3 Dosage de l'activité luciférase

On ajoute 20 μ l d'échantillon à 100 μ l de mixture réactionnelle contenant le substrat de l'enzyme. L'émission de photons est ensuite mesurée pendant 30 s dans un bioluminomètre. Cette production de photons est directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme et s'exprime en RLU (*relative light unit*).

4.4.3.4 Dosage de l'activité β -galactosidase

Dans une boîte 96 puits, on ajoute 40 μ l d'échantillon à 40 μ l de mixture réactionnelle contenant le substrat de l'enzyme. La composition de cette mixture est pour 50ml : 200 mM Na_3PO_4 ; pH 7,3; 50 μ l de MgCl_2 2M ; 350 μ l de 2-mercapto-éthanol et 66,5 mg d'ONPG (O-nitrophénylgalactopyranoside) (Sigma, USA). Le produit de réaction obtenu après le clivage du substrat ONPG par l'enzyme présente un pic d'absorbance à 405nm. L'absorbance est lue après différents temps d'incubation à 37° C jusqu'à l'obtention de valeurs de densité optique (DO) comprises entre 0,1 et 0,5.

Les valeurs du dosage de l'activité luciférase sont ensuite normalisées par celles obtenues pour la mesure de l'activité β -galactosidase. Les résultats sont donc calculés en RLU / DO et exprimés arbitrairement en nombre de fois d'augmentation du contrôle.

4.5 Immunofluorescence et microscopie confocale

Cette approche a été utilisée afin de rechercher l'abondance de la protéine mtCLIC, sa localisation ainsi que sa co-localisation avec un constituant mitochondrial tel que COX IV, la sous unité IV de la cytochrome oxydase codée par le génome nucléaire, dans les différentes lignées cellulaires. L'immunofluorescence a également été utilisée pour estimer le taux de transfection des cellules L9929dADNmt avec les plasmide codant le gène mtCLIC, ou mtCLIC-GFP. De plus, par des expériences de double marquage, nous avons cherché à montrer que les protéines mtCLIC ou mtCLIC-GFP surexprimés co-localisent avec COX IV, attestant qu'une partie au moins est localisée dans la mitochondrie. La déplétion en ADN mitochondrial, a pu également être mise en évidence grâce à cette technique, en visualisant la protéine COX I, sous unité I de la cytochrome oxydase, codée par le génome mitochondrial. Ce marquage a également été effectué sur les cellules cybrides MERRF sauvages et mutées, et sur des cellules 143B et 143B ρ^0 .

4.5.1 Principe du microscope confocal

La microscopie confocale permet de collecter de l'information à partir d'une section optique de haute définition, plutôt qu'à partir de l'échantillon entier comme c'est le cas pour les microscopes optiques à épifluorescence.

La source lumineuse utilisée est un laser CRYPTON-ARGON qui offre 3 lignes d'excitation (488 nm, 568 nm, 647 nm) permettant des marquages multiples. A l'excitation, un diaphragme d'ouverture permet la focalisation du faisceau incident en un point déterminé. Le balayage de ce faisceau en xy va fournir une image dans le plan xy. A la détection, seuls les rayons émis à partir du plan focal arrivent au niveau du détecteur, ce qui augmente les contrastes et la résolution apparente.

L'image est ensuite digitalisée. Une prise d'images dans différents plans successifs peut permettre, par la suite, une reconstruction tridimensionnelle du spécimen. De plus, la superposition d'images permet de visualiser la co-localisation de différentes protéines marquées par des fluorochromes différents. Un schéma synthétique reprenant les principales composantes d'un microscope confocal est présenté à la figure 2.8.

4.5.2 Marquage immunocytochimique

Les différents types cellulaires utilisés (L929, L929dADNmt, 143B, 143B \square^0 , MERRF sauvages et mutées) sont sous-cultivés 2 jours avant le marquage dans des boîtes 24 puits sur des lames porte-objets stérilisées à l'alcool à une densité de 25000 cellules par puits. Dans certaines conditions, les cellules L929 et L929 déplétées en ADN mitochondrial sont transfectées avec le Superfect, le jour précédant le marquage, avec 1 \square g de plasmide codant pour mtCLIC ou mtCLIC-GFP. Les rapports ADN-Superfect sont de 1 \square 5 et le temps de transfection est de 6 h.

Le jour du marquage, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS préchauffé à 37°C. Elles sont ensuite fixées pendant 10 min avec 1 ml de paraformaldéhyde 3% préchauffé à 37° C. Après une nouvelle série de 3 rinçages avec 1 ml de PBS, elles sont perméabilisées pendant 5 min à température ambiante avec 1 ml de PBS contenant 1 % de triton X-100 (Sigma, USA).

Incubation avec l'anticorps primaire \square On dépose 30 \square l d'anticorps dilué dans du PBS contenant 1 % de BSA sur un parafilm placé en chambre humide. La lamelle porte-objet est retournée sur le parafilm. L'incubation des cellules en présence de l'anticorps primaire se déroule pendant 18 h à 4° C. Après cette incubation, les lamelles sont remises dans la boîte de culture. Les anticorps de souris utilisés contre COX I et COX IV (Molecular Probe, USA)

sont dilués 20 et 40 fois respectivement. L'anticorps utilisé contre mtCLIC est l'anticorps 129. Il est dilué 1000 fois.

On effectue ensuite trois rinçages avec 1 ml de PBS contenant 1 % de BSA pour éliminer l'excès d'anticorps primaire non fixé.

Incubation avec l'anticorps secondaire □ La méthode est la même que celle décrite pour l'anticorps primaire. Cependant, l'incubation en présence de l'anticorps secondaire ne dure qu'une heure à température ambiante et se déroule dans l'obscurité afin de préserver le fluorochrome. Les anticorps secondaires Alexa anti-souris et anti-lapin (Molecular Probes, USA) sont dilués 500 fois dans du PBS contenant 1 % de BSA.

Dans les cellules transfectées avec la construction codant mtCLIC-GFP, le marquage avec l'anticorps anti-mtCLIC est inutile. La protéine GFP, une fois exprimée, fluoresce naturellement (Ex 568 nm) et peut être observée sans traitement particulier.

On rince alors les cellules 3 fois avec 1 ml de PBS contenant 1 % de BSA afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire et finalement avec 1ml de PBS.

Pour le montage: Une goutte de Mowiol (Sigma-Aldrich, Angleterre) préchauffé à 56° C est déposé sur une lame dégraissée à l'alcool (Memzel-Gloser, Allemagne). La lamelle porte-objet est retournée sur la goutte en évitant la formation de bulles d'air. Les lames sont enfin placées dans une boîte pendant 16 h à 4° C avant l'observation des cellules au microscope confocal.

4.6 Test de liaison du facteur de transcription p53 en multipuits

Afin de déterminer l'activité de liaison du facteur de transcription p53 à sa séquence consensus, nous avons réalisé un test de liaison de ce facteur en multipuits à partir d'extraits protéiques nucléaires des lignées cellulaires utilisées dans ce travail (L929, L929 déplétées en ADN mitochondrial, 143B, 143B \square^0 , MERRF sauvages et MERRF mutée)

4.6.1 Principe du test

Dans une plaque 96 puits dont les puits sont tapissés de streptavidine, on fixe un fragment d'ADN contenant la séquence consensus du facteur de transcription d'intérêt. Ce

fragment d'ADN, biotinylé pour permettre la fixation, contient non seulement la séquence reconnue par la protéine, mais également un fragment «*Spacer*». Ce bras permet d'éloigner le site de fixation du facteur du fond du puits. Le principe de ce test colorimétrique, mis au point pour le facteur NF- κ B, est illustré à la figure 2.9 (Renard *et al.*, 2001). Des extraits nucléaires préparés à partir des différentes lignées cellulaires sont incubés dans les puits. Après plusieurs rinçages, un anticorps primaire dirigé contre un épitope du facteur de transcription d'intérêt est placé dans les puits. Après plusieurs rinçages, un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) est également ajouté dans les puits. La révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme. L'absorbance du produit de cette réaction colorimétrique est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 450 nm.

4.6.2 Extraction nucléaire

4.6.2.1 Solutions

- PBS contenant 1 mM Na₂MoO₄ (Sigma USA) + 5 mM NaF (Merck, Allemagne)
- HB 2X (tampon hypotonique) \square Hepes (ACROS organics, USA) 20 mM; NaF 5 mM; Na₂MoO₄ 1 mM; EDTA (Ethylenedinitrilo tetra acetic acid, Merck Allemagne) 0,1 mM
- Tampon de lyse : 10 ml de HB 2X, 400 \square l NP-40 10%, 9,6 ml H₂O
- Tampon de resuspension \square 10 ml HB 2X, 4 ml Glycérol, 6 ml H₂O
- Tampon salin \square 10 ml HB 2X, 4 ml Glycérol 4 ml NaCl 4 M 2 ml H₂O
- Cocktail d'inhibiteur de phosphatases (PIB) \square 100 \square l NaVO₃ 1 M, 1 ml PNPP (p-nitrophénylphosphate) 1M, 1ml \square -glycérophosphate, 0,5 ml NaF, 1,4 ml H₂O
- Cocktail d'inhibiteur de protéases : Roche, Allemagne.

4.6.2.2 Méthode

Toutes les étapes de préparation des extraits nucléaires à partir des cellules cultivées dans des boîtes de 75 cm² sont réalisées à 4° C. Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS. Elles sont ensuite rincées dans du PBS contenant 1 mM Na₂MoO₄ et 5 mM NaF. Un rinçage de 3 min, réalisé avec du tampon HB, permet de

faire gonfler les cellules. On racle ensuite dans 500 μ l de tampon de lyse. Le lysat récupéré est placé dans un eppendorf et centrifugé pendant 30 s à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 100 μ l de tampon de resuspension contenant 4 μ l d'inhibiteurs de protéases et 4 μ l d'inhibiteurs de phosphatases. Une fois le culot resuspendu, on ajoute un volume équivalent de tampon salin contenant 4 μ l d'inhibiteurs de protéases et 4 μ l d'inhibiteurs de phosphatases. L'extraction des protéines nucléaires est réalisée dans un eppendorf placé sur un agitateur rotatif pendant 30 min. On centrifuge alors 10 min à 13000 rpm. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré, aliquoté et conservé à -70°C . Un dosage de protéine par la méthode de Bradford est réalisé sur un aliquot afin de déterminer la concentration en protéines dans les échantillons.

4.6.3 Dosage de la liaison de p53 à sa séquence consensus à partir d'extraits de protéines nucléaires.

4.6.3.1 Solutions

- Tampon de liaison (stock) 2X : Tris-HCl 40 mM pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, Glycérol 20 %, MgCl_2 10 mM, DTT 2 mM.
- Tampon de liaison final (à préparer fraîchement) : 500 μ l de tampon de liaison 2X, 1 μ l de DTT, 5 μ l de Poly dl-dc 1 g/ μ l, 494 μ l H_2O .
- PBS_{50} : NaCl 50 mM, Phosphate 10 mM pH 7,5
- Tampon HB
- Tampon de resuspension et tampon salin PIB et PIC
- Inhibiteurs de phosphatases et de protéases.

4.6.3.2 Méthode

4.6.3.2.1 Fixation du trappeur de p53 dans les puits d'une plaque 96 puits tapissés de streptavidine

Le trappeur p53 couplé à la biotine est placé dans chaque puits. Par puits, on dépose 50 μ l contenant 305 picomoles de trappeur et on incube 1 h à 37°C . On réalise ensuite 2

rinçages dans 100 μ l de PBS₅₀ et un rinçage à l'eau. Suite à un séchage, la plaque est stockée à 4° C jusqu'au jour du dosage.

4.6.3.2.2 *Liaison*

Dans chaque puits, on ajoute 40 μ l de tampon de liaison 1 X et 10 μ l de l'extrait de protéines nucléaires dilué dans le tampon de lyse à une concentration de 5 μ g / 10 μ l. Une incubation d'une heure est réalisée à température ambiante et sous agitation douce. Les puits sont lavés 3 fois avec 200 μ l de PBS₅₀ contenant du Tween-20 à 0,1%.

4.6.3.2.3 *Fixation des anticorps primaires*

Dans chaque puits, on ajoute 100 μ l d'anticorps primaire anti-p53 (Santa-Cruz, USA) dilué 1000 X dans du PBS₅₀ contenant 0,5 % de BSA.

Après une incubation d'une heure à température ambiante, les puits sont rinçés 3 fois avec 20 μ l de PBS₅₀ contenant du Tween-20 à 0.1 %.

4.6.3.2.4 *Fixation de l'anticorps secondaire (anti lapin) couplé à la peroxydase*

Dans chaque puits, on place 100 μ l d'anticorps secondaire (Santa-Cruz, USA) dilué 1000 X dans du PBS₅₀ contenant du lait gloria à 1 %. Après une incubation de 60 min à température ambiante, on rince 3 fois avec du PBS₅₀ contenant du Tween 20 à 0,1 %.

4.6.3.2.5 *Révélation*

Enfin, pour la révélation, on ajoute 100 μ l de TMB (Tétra-Méthyl Benzidine, Biosource, Belgique) dans chaque puits. L'incubation est ensuite réalisée à l'abri de la lumière pendant 10 min. Au terme de cette incubation, on ajoute 100 μ l de solution d' H₂SO₄ (Biosource, Belgique) par puits. La densité optique peut dès lors être mesurée au spectrophotomètre à 450 nm (référence 655 nm).

4.7 Mesure du potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la rhodamine 123 (R123) et marquage des mitochondrie au Nonyl Acridine Orange (NAO)

Un marquage au NAO a été réalisé sur des cellules L929 et L929 déplétées en ADN mitochondrial afin de quantifier l'abondance des mitochondries dans ces deux lignées

cellulaires. Le potentiel de membrane mitochondrial a quant à lui été mesuré au cours de ce travail en utilisant la sonde fluorescente R123, afin de visualiser l'effet de molécules telles que l'agent découplant FCCP (1 ou 10 μ M) et l'inhibiteur de canaux chlore IAA-94 (0,1 1 10 50 et 100 μ M). Le potentiel de membrane mitochondrial a également été mesuré dans des cellules surexprimant la protéine mtCLIC ou mtCLIC-GFP ou les dominants négatifs p53(R175H) et K-CREB.

4.7.1 Principe

La sonde NAO se fixe aux cardiolipines présent dans la membrane mitochondriale interne d'une façon indépendante du potentiel de membrane. Ce marquage permet donc une quantification de la population mitochondriale présente dans les cellules. Le potentiel de membrane mitochondrial peut, quant à lui, être estimé en utilisant des sondes fluorescentes qui s'accumulent dans la matrice mitochondriale en fonction de ce potentiel.

4.7.2 Méthode

Dans certaines conditions, les cellules sont repiquées la veille de la mesure à des densités variables ou à une densité de 200.000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits. Elles sont ensuite incubées pendant 14 h en présence ou non d'IAA-94 (0,1 1 10, 50 ou 100 μ M). Le FCCP à 1 ou 10 μ M est quant à lui ajouté ou non selon les conditions 2 h avant la mesure. Dans une autre condition, les cellules sont transfectées transitoirement dans des boîtes 24 puits comme décrits au point **2.4**. 24 h avant la mesure avec 1 μ g de plasmide codant soit pour la protéine mtCLIC, mtCLIC-GFP, soit pour R175H ou pour K-CREB. Les cellules contrôles sont transfectées avec 1 μ g de vecteur vide.

Au terme des incubations, ou 24 h post-transfections, les cellules sont rincées délicatement avec 1 ml de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) préchauffé à 37° C dont la composition est pour un litre de 8 g NaCl, 0,4 de KCl, 60 mg Na₂HPO₄- 2 H₂O, 60 mg KH₂ PO₄, 100 mg MgSO₄-7 H₂O, 0,147 g CaCl₂, 1 g de glucose et 100 mg MgCl₂ (tous ces produits viennent de chez Merck, Allemagne). En fonction des conditions, la rhodamine 123 ou le NAO, dilués dans du HBSS à une concentration de 10 μ M, sont ensuite ajoutés à raison de 0,5 ml par puits. Après une incubation de 30 min à 37° C, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de HBSS, puis lysée avec 150 μ l de tampon de lyse (Passive Lysis Buffer,

Promega, USA) et laissées 15 min à température ambiante sous agitation douce. Les lysats cellulaires obtenus sont récupérés en eppendorf et centrifugés 3 min à 13000 rpm. On prélève ensuite 100 μ l du surnageant que l'on place dans une plaque 96 puits. La fluorescence est alors mesurée avec un spectrofluorimètre (FLUOstar, BMG lab technologies, Allemagne). Les longueurs d'onde caractéristiques de la rhodamine 123 et du NAO sont respectivement de 485 nm et de 494 nm pour l'excitation et de 520 nm et 519 nm pour l'émission. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence et représentent la moyenne \pm un écart-type pour n = 4 tests.

4.8 Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont exprimés comme la moyenne \pm un écart-type. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à chaque fois que les résultats et le nombre de réplicats le permettaient. L'analyse de la variance sur ANOVA 1, suivie de contrastes de Scheffé ont été utilisés pour rechercher les différences significatives entre les moyennes.

5 **RESULTATS ET DISCUSSION**

Le gène codant pour la protéine mtCLIC a été identifié, cloné et caractérisé au cours d'une expérience menée sur des kératinocytes issus de souris BALB/c knock-out pour p53 (p53^{-/-}) et sauvages (p53^{+/+}), et dont la différenciation est induite par une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire.

Le gène codant pour mtCLIC possède une phase ouverte de lecture de 762 paires de bases. L'ARNm transcrit à son niveau fait 4,25 Kb et est traduit en une protéine de 250 acides aminés, ce qui lui confère un PM d'environ 28 Kd. Elle possède au moins un domaine transmembranaire et plusieurs sites de phosphorylations possibles. Exprimée dans la plupart des tissus murins, elle est néanmoins plus abondante au niveau du coeur, de la peau, des poumons, du foie et des reins. Sa présence est détectée très tôt dans l'embryogenèse de la souris (au stade 2 cellules).

Cette étude a également montré que l'abondance de la protéine mtCLIC semble dépendre de la présence de p53. En effet, l'expression de mtCLIC est plus faible dans des cellules p53^{-/-}. Cette abondance semble également sensible aux variations de concentration en calcium extracellulaire. Cependant, le calcium est utilisé pour induire la différenciation et aucune donnée ne montre que la concentration intracellulaire en calcium est modifiée dans ces conditions. Nous ne savons donc pas si la surexpression de mtCLIC est le résultat de la différenciation en elle même ou si le calcium active une voie qui contrôle son expression. Enfin, cette équipe a également constaté que l'expression de la protéine mtCLIC est induite dans des kératinocytes incubés en présence de TNF α (Fernandez-Salas *et al.*, 1999).

Les objectifs de ce travail sont donc, dans un premier temps, de rechercher et de vérifier les mécanismes de régulation de l'expression de la protéine mtCLIC dans notre modèle cellulaire, mais également de chercher les relations de causes à effets éventuelles qui relient ces différents facteurs.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à la fonction biologique que pourrait exercer mtCLIC au sein des mitochondries de cellules L929 déplétées en ADNmt, en examinant son rôle dans le maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial dans ces

cellules. Tout d'abord, nous allons vérifier que la surexpression de mtCLIC est bien la conséquence d'un dysfonctionnement mitochondrial.

5.1 Confirmation de la surexpression du gène codant la protéine mtCLIC en cas de dysfonctionnement mitochondrial

L'augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine mtCLIC dans des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial (L929dADNmt), identifié par la technique de la RT-PCR «*differential display*», a donc été confirmée au niveau protéique par un marquage en immunofluorescence. Néanmoins, avant de commencer l'étude de la régulation de l'expression de ce gène, nous nous sommes assurés que l'augmentation d'abondance de mtCLIC était bien induite par un dysfonctionnement mitochondrial et non le résultat d'un effet non spécifique lié au traitement des cellules avec le bromure d'éthidium.

Nous avons donc recherché l'abondance de la protéine mtCLIC en Western blot à partir de cellules L929dADNmt et de cellules L929 incubées ou non (cellules contrôles) pendant 6 h en présence d'inhibiteurs métaboliques de l'activité mitochondriale tels que l'oligomycine (8 μ M), l'antimycine A (1 μ M) et le FCCP (10 μ M).

Au terme des incubations, le milieu de culture a été remplacé par du DHG + 10 % FBS et les cellules ont pu récupérer du stress pendant 18 h. La lyse cellulaire a ensuite été réalisée et 20 μ g de protéines ont été chargés dans un gel SDS-PAGE 12 % pour l'analyse en Western blot de l'abondance de mtCLIC et de p53. Les résultats sont présentés à la figure 3.1. On observe sur cette figure que l'abondance de la protéine mtCLIC est plus importante dans les cellules L929dADNmt que dans les cellules L929 contrôles (pistes 1 et 2). De plus, les trois inhibiteurs des phosphorylations oxydatives utilisés sont capables d'induire l'expression ou de stabiliser la protéine mtCLIC (pistes 3, 4 et 5). A ce propos, des données obtenues au laboratoire par la technique du Northern blot permettent de suggérer que le taux de transcription de mtCLIC est plus important dans les L929dADNmt. Sa régulation passerait donc probablement par une élévation du taux de transcription plutôt que par une stabilisation de la protéine. Remarquons que l'abondance du facteur de transcription p53 est faible et ne varie pas dans les différentes conditions.

On peut donc conclure que la surexpression de la protéine mtCLIC observée dans les cellules L929dADNmt est bien due à un dysfonctionnement mitochondrial et non pas à la présence de bromure d'éthidium dans le milieu de culture. En effet, une inhibition métabolique de la mitochondrie induit également l'accumulation de mtCLIC. De plus, l'expression du facteur de transcription p53 n'est pas induite par un stress mitochondrial. En effet, le signal observé pour mtCLIC augmente en cas d'inhibition de l'activité mitochondriale, mais pas celui de p53. La surexpression de la protéine mtCLIC apparaît donc bien comme une réponse de la cellule à un stress mitochondrial. Ajoutons encore que c'est la première fois que nous confirmons la surexpression de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt au niveau protéique par une analyse en Western blot.

5.2 Confirmation de la localisation mitochondriale de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt

Plusieurs études menées par l'équipe du professeur Yuspa (NIH, USA), qui a cloné le gène codant la protéine mtCLIC, indiquent une localisation mitochondriale et cytosolique de la protéine mtCLIC (Fernandez-Salas *et al.*, 1999). De plus, très récemment, ils ont montré que mtCLIC est une protéine de la membrane mitochondriale interne (Fernandez-Salas *et al.*, 2002). Afin de rechercher la localisation de cette protéine dans notre lignée cellulaire, nous avons réalisé un double marquage en immunofluorescence sur des cellules L929dADNmt en utilisant des anticorps dirigés contre le domaine C-terminal de la protéine mtCLIC (Ac 129) et contre COX IV, la sous-unité IV de la cytochrome oxydase, codée par le génome nucléaire. Des cellules L929dADNmt, choisies pour le marquage en raison de la plus grande abondance de mtCLIC (voir figure 1.33), ont donc étéensemencées deux jours avant le marquage sur des lames couvre objet à une densité de 25000 cellules par puits dans une boîte 24 puits. Le jour du marquage, elles sont fixées à la paraformaldéhyde et perméabilisées en présence de triton X-100. Elles ont ensuite été incubées en présence des anticorps primaires (anticorps de lapin anti-mtCLIC et anticorps de souris anti-COX IV) puis en présence des anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris conjugués à deux fluorochromes différents. Un montage sur lame porte-objet réalisé au Mowiol est suivie d'une observation en microscopie confocale.

À la figure 3.2, on remarque que les protéines mtCLIC (vert) et COX IV (rouge) sont très abondantes dans les cellules L929dADNmt. Les marquages montrent une expression diffuse et cytoplasmique des deux protéines. On n'observe pas de marquage dans le noyau.

Comme le démontrent les nombreuses zones de co-localisation (jaune) après superposition des images, les deux protéines sont présentes ensemble à de nombreux endroits. Ces résultats montrent donc une localisation mitochondriale et cytosolique de mtCLIC dans notre modèle cellulaire de L929dADNmt. Ils confirment donc les localisations observées dans les kératinocytes. Rappelons qu'il est difficile de savoir si la localisation cytosolique de mtCLIC correspond à une étape intermédiaire de translocation vers la mitochondrie ou si elle y exerce une fonction.

D'autres méthodes auraient également pu nous permettre d'obtenir des informations sur la localisation et l'abondance subcellulaire de mtCLIC. Par exemple, une centrifugation différentielle suivie d'une analyse en Western blot sur les différentes fractions obtenues aurait permis de confirmer ou non la présence de mtCLIC au niveau mitochondrial et de comparer les abondances mitochondriales et cytosoliques de cette protéine.

5.3 Recherche des mécanismes de régulation de l'expression du gène codant la protéine mtCLIC dans les cellules L929 et L929 déplétées en ADN mitochondrial

Comme décrit par Fernandez-Salas et al, le facteur de transcription p53 semble donc impliqué dans la régulation de l'expression de la protéine mtCLIC (Fernandez-Salas *et al.*, 1999). Pour rechercher le rôle de p53 dans le contrôle de l'expression de mtCLIC dans les L929 et L929dADNmt, nous avons dans un premier temps transfecté des cellules L929 avec un plasmide codant pour la forme sauvage de p53. Nous avons ensuite recherché l'abondance de mtCLIC dans ces cellules. Un contrôle positif est réalisé en transfectant des cellules avec une construction codant pour mtCLIC.

Des cellules L929, sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm², sont transfectées transitoirement au Superfect pendant 6 h avec 5 µg de plasmide codant pour la protéine p53 ou la protéine mtCLIC. Le milieu de transfection est ensuite enlevé et les cellules récupèrent pendant 18 h dans du DHG + 10 % de FBS. Au terme de cette récupération, les cellules sont lysées et l'analyse de l'abondance de mtCLIC est recherchée en Western blot à partir de 50 µg de protéines de lysats clairs. Ces conditions de transfection ont été optimisées au laboratoire et l'efficacité de transfection dans nos types cellulaires (L929 et L929dADNmt) se situe entre 40 et 60 % (voir figure 2.5). Les résultats présentés à la figure 3.3 montrent que dans les cellules qui surexpriment p53, l'expression de la protéine mtCLIC est légèrement augmentée

(piste 2). Comme attendu, l'abondance de mtCLIC est également plus importante dans les cellules surexprimant mtCLIC (piste 3). Nous pouvons donc conclure que dans les cellules L929, la présence du facteur de transcription p53 semble jouer un rôle dans la régulation de l'expression du gène codant pour mtCLIC. En effet, la surexpression de p53 dans les cellules L929 induit l'accumulation de mtCLIC. Mentionnons que malgré une efficacité de transfection relativement importante dans nos conditions comme le démontre l'accumulation de mtCLIC après sa propre surexpression, nous ne contrôlons pas le taux de transfection dans nos différentes expériences. Des approches de transfection stables ou l'approche rétrovirale permettant d'obtenir une lignée de cellules L929 exprimant p53 de manière stable dans un système inductible serait une alternative à ces problèmes d'efficacité de transfection.

Nous avons ensuite cherché à savoir si le TNF α pouvait induire la surexpression de la protéine mtCLIC dans les cellules L929. Dans un premier temps, nous avons donc cherché l'abondance de mtCLIC dans des cellules L929 préalablement incubées pendant 14 h avec du TNF α à 10, 40, et 80 ng/ml. L'abondance de mtCLIC dans ces conditions est comparée à l'abondance dans des cellules L929 et L929dADNmt et utilisées comme contrôles. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.4. On confirme bien que la protéine mtCLIC est plus abondante dans les cellules L929dADNmt que dans les cellules L929. Ce résultat confirme donc l'expression différentielle de mtCLIC dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial. De plus, après 14 h d'incubation en présence de TNF α , l'expression de la protéine mtCLIC est fortement augmentée dans les cellules L929. Précisons que les concentrations utilisées dans ces conditions ont été choisies sur base des concentrations utilisées par Fernandez-Salas *et al.* au cours de la caractérisation de mtCLIC dans les kératinocytes de souris (Fernandez-Salas *et al.*, 1999).

5.3.1 Recherche de l'activité de p53 dans les cellules L929 et L929dADNmt

Bien que qu'une reproduction de ces expériences est nécessaires, nous venons de voir que la protéine p53 est peut être impliquée dans l'expression de la protéine mtCLIC (Fig 3.3), et que l'incubation des cellules L929 en présence de TNF α (Fig 3.4) ou d'inhibiteurs métaboliques de l'activité mitochondriale (Fig 3.1) induit également une augmentation d'abondance et donc probablement d'expression de la protéine. Afin de lier ces deux dernières observations à l'activité transcriptionnelle de p53, nous avons cherché à déterminer

l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 dans des cellules L929 et L929dADNmt. Nous avons également recherché l'effet d'une incubation de ces cellules en présence d'antimycine A, d'oligomycine ou de TNF α sur l'activité transcriptionnelle de p53. Pour cela, nous avons utilisé un système rapporteur de l'activité transcriptionnelle dépendante de p53. Le plasmide utilisé, pG13-luc, contient le gène codant pour la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 13 séquences reconnues par p53.

Dans un premier temps, nous avons commencé par vérifier l'efficacité de ce système rapporteur. Pour ce faire, des cellules L929 ont été co-transfectées transitoirement avec le plasmide pG13-luc, un plasmide codant pour la β -galactosidase et une construction codant pour la protéine p53 sauvage. Les cellules contrôle sont co-transfectées avec le vecteur pGL2.

Les cellules L929, sous-cultivées à une densité de 50000 cellules par puits dans une boîte de 12 puits, sont co-transfectées au Superfect avec 0,25 μ g de chaque construction pendant 6 h. Les cellules récupèrent ensuite dans du DHG + 10 % FBS. Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées 24 h après la transfection. Les résultats des mesures de l'activité luciférase, normalisés par l'activité β -galactosidase sont présentés à la figure 3.5. On constate, comme attendu, que l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 est fortement augmentée dans les cellules L929 qui surexpriment la protéine p53 sauvage (environ 40 fois par rapport au contrôle). L'efficacité du système rapporteur et des conditions de transfections sont donc vérifiées.

Nous avons ensuite mesuré l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 dans des cellules L929 et L929dADNmt préalablement incubées ou non en présence d'inhibiteurs métaboliques de l'activité mitochondriale ou de TNF α .

Les cellules L929 et L929dADNmt,ensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans des boîtes 12 puits, sont co-transfectées au Superfect pendant 6 h avec 0.25 μ g de plasmide pG13-luc et de plasmide codant pour la β -galactosidase. Après une période de récupération de 18 h dans du DHG + 10 % FBS, elles sont ensuite incubées ou non pendant 6 h en présence d'antimycine A (1 μ M), d'oligomycine (8 μ M) ou de TNF α (20 ng/ml). Les activités luciférase et β -galactosidase sont mesurées au terme des incubations (Figure 3.6). Les résultats de cette expérience montrent que l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 est significativement plus élevée dans les cellules L929dADNmt que dans les cellules L929 (environ 5 fois dans cette expérience).

On constate également que les inhibiteurs des phosphorylations oxydatives n'ont pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle de p53 dans les cellules L929dADNmt. Bien qu'on observe une petite augmentation de l'activité de p53 dans les L929 incubées en présence d'antimycine A ou d'oligomycine (environ deux fois), ces différences ne sont pas statistiquement significatives. Par contre, on observe que le TNF α est capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 et ce, dans les deux lignées cellulaires.

Nous venons donc de montrer que le facteur de transcription p53 ainsi que le TNF α étaient tous deux capables d'induire une accumulation de mtCLIC dans les cellules L929 (figures 3.3 et 3.4). De plus, une incubation de 6 h en présence de TNF α (20 ng/ml) entraîne également une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 (figure 3.6). Les inhibiteurs mitochondriaux sont également capables d'induire une surexpression de mtCLIC (figure 3.1) dans les cellules L929. Néanmoins, l'effet de ces inhibiteurs sur l'activité transcriptionnelle de p53 dans les L929 est faible après 6 h d'incubation (figure 3.6).

5.3.2 Toxicité induite par le TNF α

Nous nous sommes rendus compte que les cellules L929 présentait une sensibilité très importante au TNF α . En effet, comme le montre la figure 3.7 présentant les quantités de protéines récupérées à partir des cellules L929 incubées ou non pendant 14 h avec du TNF α à 10, 40 et 80 ng/ml et utilisées pour l'analyse de l'abondance de mtCLIC (figure 3.4), cette cytokine est très toxique. Il est donc possible que l'augmentation d'abondance de mtCLIC analysée en Western blot réalisé à partir des lysats de cellules restant attachées après rincages, soit le reflet de la surexpression de mtCLIC par une sous-population de cellules plus résistantes au TNF α . Nous avons confirmé et quantifié la cytotoxicité induite par le TNF α par un test basé sur la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) relarguée dans le milieu de culture par des cellules endommagées dont la perméabilité membranaire est augmentée. Cette mesure a été réalisée sur des cellules L929 traitées ou non pendant 14 h avec différentes concentrations en TNF α allant de 0,25 à 80 ng/ml. Au terme des incubations, le milieu de culture est récolté, centrifugé et l'activité est mesurée sur le surnageant. On constate à la figure 3.8.1 que la cytotoxicité du TNF α augmente de manière dose-dépendante et atteint une phase plateau à partir de 10 ng/ml. Ce résultat est en accord avec la diminution de la quantité de protéines récoltée dans les mêmes conditions (figure 3.7). De plus, la toxicité du TNF α , un inducteur de la nécrose et de l'apoptose, se manifeste

également par le détachement de certaines cellules dont la perméabilité membranaire n'est pas ou pas encore modifiée. Afin de tenir compte de cette toxicité, masquée par le principe même du test, nous avons également mesuré l'activité de la LDH libérée par les cellules sédimentées dans les culots après centrifugation, et ce sur les mêmes échantillons. Les culots ont donc été resuspendus dans une solution de triton X-100, et l'activité de la LDH a ensuite été mesurée (Fig 3.8.2). Le profil des résultats est comparable à celui obtenu pour l'activité LDH présente dans le surnageant. Ces résultats combinés indiquent que le TNF α est capable d'induire la mort des cellules L929 et qu'une partie des cellules est détachée et présente encore une perméabilité intacte de la membrane plasmique. Le TNF α est une cytokine connue pour induire de nombreuses réponses cellulaires (MacEwan, 2002). Nous avons pu constater ici que la sensibilité cellulaire au TNF α est dépendante du type cellulaire utilisé, rappelons en effet que les concentrations en TNF α avaient été choisies sur base de celles utilisées par Fernandez *et al.* sur des kératinocytes. En ce qui concerne la sensibilité des L929 au TNF α , il est rapporté dans la littérature que la mortalité cellulaire induite peut se manifester à la fois par de la nécrose et de l'apoptose (Humphreys *et al.*, 1999).

5.3.3 Effets de faibles concentrations en TNF α sur l'abondance de mtCLIC et l'activité transcriptionnelle dépendante de p53

Nous avons dès lors recherché l'effet de concentrations plus faibles en TNF α à la fois sur l'abondance de la protéine mtCLIC et sur l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 dans les cellules L929 et L929dADNmt.

Tout d'abord, afin d'estimer l'effet de plus faibles concentrations en TNF α sur l'expression de la protéine mtCLIC, nous avons réalisé un Western blot à partir de lysats clairs de cellules L929 et L929dADNmt, incubées ou non au préalable en présence de TNF α à 250, 1000 ou 2500 pg/ml. Comme illustré à la figure 3.9, l'abondance de la protéine mtCLIC ne varie pas dans les cellules L929dADNmt incubées pendant 14 h avec le TNF α à ces concentrations (B). Dans les cellules L929 par contre, on peut observer une légère augmentation de l'abondance de la protéine mtCLIC pour une concentration en TNF α de 2500 pg/ml (A). La quantification de l'abondance des différents signaux par un système d'analyse d'images permettant de déterminer les densités optiques associées à chaque bande

serait nécessaire pour pouvoir tirer une conclusion formelle. Cette petite augmentation est beaucoup plus faible que l'induction de l'expression de mtCLIC dans les L929 pour des concentrations en TNF α supérieures ou égales à 10 ng/ml (figure 3.4) En effet, l'obtention d'un signal exploitable a nécessité une durée d'exposition plus longue de la membrane sur le film autoradiographique. De plus, nous travaillons ici avec 25 μ g de protéines chargés dans le gel contre 15 à la figure 3.4. Ceci explique probablement pourquoi on obtient un signal mtCLIC détectable dans la piste contrôle. Soulignons toutefois que la protéine mtCLIC est faiblement exprimée dans les cellules L929 et que sa détection en Western blot est attendue.

Nous avons ensuite recherché l'effet de faibles concentrations en TNF α sur l'activité transcriptionnelle dépendante de p53. Les cellules L929 et L929dADNmt,ensemencées dans des boîtes de 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits, ont été co-transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec 0,25 μ g de plasmide rapporteur pG13-luc et 0,25 μ g de plasmide codant pour la β -galactosidase. Après 18 h de récupération dans du DHG + 10 % FBS, elles ont ensuite été incubées ou non pendant 6 h avec des concentrations croissantes en TNF α allant de 0,1 à 2.5 ng/ml (fig 3.10). Les activités luciférase et β -galactosidase ont été mesurées au terme des incubations. On constate que le TNF α stimule légèrement l'activité transcriptionnelle de p53 dans les cellules L929 et ce, de manière dose-dépendante. Par contre, dans les L929dADNmt, les faibles concentrations en TNF α n'activent pas la transcription dépendante de p53. Ceci contraste avec les résultats obtenus pour une concentration en TNF α de 20 ng/ml (voir fig 3.6).

Il est intéressant de remarquer que même si les effets induits par le TNF α à 2500 pg/ml sont faibles on observe une certaine corrélation entre l'expression de la protéine mtCLIC et l'activation de p53 dans les cellules L929. Il serait de plus très intéressant de réaliser des cinétiques afin de rechercher les effets du TNF α à cette concentration sur l'expression de mtCLIC et l'activation de p53. En effet, le choix de ces temps de 6 h d'incubations pour la recherche de l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 et de 14 h pour l'étude de l'abondance de mtCLIC se base sur des travaux antérieurs menés au laboratoire, et ne sont peut-être pas optimaux pour visualiser les effets maximum du TNF α sur ces paramètres.

Nous avons donc montré que, dans des cellules L929, la déplétion en ADN mitochondrial (L929dADNmt), l'incubation en présence de TNF α ou d'inhibiteurs de l'activité mitochondriale entraîne à la fois une augmentation d'activité du facteur de transcription p53 (Figure 3.6) et une surexpression de la protéine mtCLIC (Figures 3.1, 3.4 et

3.9). Néanmoins, malgré l'augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 dans ces conditions, l'abondance de ce facteur ne varie pas ou peu comme le montrent les résultats obtenus en Western blot sur l'abondance de p53 dans les L929dADNmt ou les L929 incubées en présence d'antimycine A, d'oligomycine ou de FCCP (Fig 3.1). Nous avons dès lors recherché la liaison du facteur de transcription p53 à sa séquence consensus dans les cellules L929 et L929dADNmt par la technique du dosage colorimétrique en multipuits développée au laboratoire (Figure 2.9) (Renard *et al.*, 2001).

5.3.4 Dosage de la liaison du facteur de transcription p53 à sa séquence consensus

Des extraits de protéines nucléaires préparés à partir de cellules L929 et L929dADNmt confluentes sont incubés au contact de la séquence consensus de p53, fixée au fond des puits d'une plaque 96 puits par une interaction biotine-streptavidine. Après plusieurs rinçages, l'abondance du facteur de transcription p53 lié à sa séquence consensus est estimée en utilisant un anticorps reconnaissant p53, puis un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. La révélation est réalisée en présence du substrat de l'enzyme. L'absorbance du produit de cette réaction colorimétrique est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 490 nm. De cette manière, nous avons pu quantifier la liaison de p53 à l'ADN dans les cellules L929 et L929dADNmt.

Comme on peut le constater à la figure 3.11, la liaison de p53 à l'ADN est comparable dans les deux types cellulaires. Ce résultat nous permet de supposer que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 observée dans les L929dADNmt, n'implique donc ni une augmentation de l'abondance de la protéine (voir figure 3.1) ni une augmentation de la liaison de ce facteur à l'ADN. On peut donc imaginer que l'augmentation d'activité transcriptionnelle dépendante de p53 dans les L929dADNmt est plutôt dépendante de facteurs régulant indirectement la transcription dépendante de p53.

La régulation de l'activité de la protéine p53 est très complexe et implique de nombreuses modifications post-traductionnelles, à la fois de p53 mais aussi des nombreuses protéines partenaires qui interagissent avec ce facteur (Giaccia *et al.*, 1998) (Prives *et al.*, 1999). Dans notre modèle cellulaire de cellules déplétées en ADN mitochondrial, cette activation ne passerait pas par une stabilisation de la protéine. L'activité transcriptionnelle de

p53 ne dépend d'ailleurs pas uniquement de sa stabilité, on peut signaler que certaines phosphorylations touchant le domaine N-terminal de transactivation de p53 permettent de modifier ses interactions avec des composants de la machinerie basale de transcription (Prives *et al.*, 1999). Ce type d'activation ne nécessite donc pas d'accumulation de la protéine pas plus qu'une augmentation de sa liaison à sa séquence consensus.

Parmi les co-facteurs interagissant avec p53, on trouve notamment CBP (CREB-Binding Protein), qui par son activité histone acétyl-transférase, permet un remodelage de la chromatine facilitant ainsi l'activité transcriptionnelle de p53 sans nécessiter une modification de l'abondance ou de la liaison à l'ADN de la protéine. La protéine CBP n'est qu'un exemple parmi d'autres protéines interagissant avec p53. Des expériences antérieures menées au laboratoire ont montré que dans ces cellules L929dADNmt, la concentration en calcium était plus élevée et capable d'induire une cascade d'activation menant à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Arnould *et al.*, 2002). Nous savons également que le facteur de transcription CREB phosphorylé sur la sérine 133 interagit physiquement avec p53 pour renforcer l'activité transcriptionnelle de ce dernier en facilitant son interaction indirecte avec CBP (Giebler *et al.*, 2000). Ceci pourrait expliquer que dans les cellules L929dADNmt, l'activité transcriptionnelle de p53 est plus importante. Les modifications dans l'état d'activation de CREB pourraient donc se répercuter indirectement sur l'activité transcriptionnelle dépendante de p53.

La surexpression de la protéine mtCLIC dans des cellules L929 incubées en présence de TNF α ou d'inhibiteur de l'activité mitochondriale est donc corrélée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de p53, augmentation qui ne nécessiterait ni la surexpression de la protéine ni une plus grande liaison à l'ADN.

Cette corrélation étant établie, il est maintenant intéressant de chercher un lien éventuel entre le TNF α , les inhibiteurs mitochondriaux et la protéine p53 sauvage. La question à laquelle nous allons tenter de répondre dans la suite de ce chapitre est de savoir si l'augmentation d'expression de mtCLIC dans les cellules L929, induite par le TNF α ou les inhibiteurs mitochondriaux est médiée par une augmentation d'activité du facteur de transcription p53.

5.3.5 Recherche de l'implication de p53 et CREB dans la régulation de l'expression de mtCLIC

Dans les expériences qui vont suivre, nous allons rechercher le rôle joué par p53 dans la régulation de la surexpression de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt, dans les cellules L929 incubées en présence de TNF α ou d'inhibiteurs des phosphorylations oxydatives tels que l'antimycine A et le FCCP. Nous tenterons également de rechercher le mécanisme par lequel p53 pourrait contrôler l'expression de mtCLIC dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial tout en conservant un taux d'expression faible et sans augmentation de sa liaison à sa séquence consensus. Pour cela, nous testerons l'hypothèse émise par Giebler et al qui proposent que la phosphorylation du facteur CREB, qui se lie à p53, aide au recrutement de la CBP, et ce faisant, renforce l'activité transcriptionnelle dépendante de ce dernier facteur (Giebler *et al.*, 2000).

Afin de pouvoir inhiber l'activité transcriptionnelle dépendante de p53, nous disposons, au laboratoire, d'un plasmide codant pour une forme mutée de la protéine p53. Ce dominant négatif résulte de la substitution de l'arginine en position 175 par une histidine (R175H) (Baker *et al.*, 1990). Suite à sa surexpression, cette protéine mutée s'incorpore dans la structure tétramérique de p53 et inhibe sa liaison à l'ADN. La protéine p53 (R175H) exerce donc une activité de dominant négatif.

Comme nous l'avons décrit au point 1.4.3.1 de l'introduction, le facteur de transcription CREB, une fois phosphorylé sur la sérine 133, interagit physiquement avec p53 pour moduler positivement l'activité transcriptionnelle de ce dernier. C'est pourquoi nous utiliserons également dans ce travail un plasmide codant pour K-CREB, un dominant négatif de CREB où l'arginine en position 287 est remplacée par une leucine. Ce dominant négatif dimérise avec le facteur CREB endogène, et empêche la liaison à sa séquence consensus d'ADN (Walton *et al.*, 1992).

Les effets de la surexpression de ces deux dominants négatifs sur l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 dans les cellules L929 et L929dADNmt sont présentés à la figure 3.12. Les cellules L929 et L929dADNmt sont co-transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec 0,25 μ g d'un plasmide pG13-luc et d'une construction codant pour la β -galactosidase. Elles sont également transfectées selon les conditions avec 0.5 μ g d'un plasmide codant pour p53 (R175H) ou K-CREB. Une condition où les cellules sont

transfectées avec 0,25 μ g des deux constructions a également été testée. Les cellules contrôles sont transfectées avec les mêmes quantités d'ADN pour le rapporteur pG13-luc et la β -galactosidase, et avec 0,5 μ g de vecteur pGL2. Les cellules récupèrent ensuite pendant 18 h dans du DHG + 10 % FBS. Les activités luciférase et β -galactosidase sont ensuite dosées. On constate que l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 est complètement inhibée dans les cellules L929dADNmt qui surexpriment K-CREB, p53 (R175H) ou les deux dominants négatifs ensemble. On observe également une petite diminution de l'activité de p53 dans les cellules L929 qui surexpriment ces dominants négatifs, bien que cette diminution ne soit pas significative.

Comme attendu, le dominant négatif de p53, p53(R175H) inhibe l'activité transcriptionnelle dépendante de ce facteur. Nous pouvons également conclure que l'hypothèse de Giebler et al. semble vérifiée dans notre modèle cellulaire L929dADNmt, puisque la surexpression de K-CREB inhibe complètement l'activité transcriptionnelle de p53. Ce dominant négatif pourra donc nous servir d'outil moléculaire pour diminuer l'activité de p53 dans les cellules.

L'efficacité du dominant négatif de p53 a également été testée sur l'activité de transcription de ce facteur dans des cellules qui surexpriment la protéine p53 sauvage.

Les cellules L929, ensemencées à raison de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 12 puits, sont co-transfectées pendant 6 h au Superfect avec le plasmide rapporteur pG13-luc (0,25 μ g), le plasmide codant pour la β -galactosidase (0,25 μ g) et 0,75 μ g d'un vecteur pGL2 (contrôle) ou de plasmide codant pour p53 sauvage. Selon les conditions, elles seront également transfectées avec des quantités croissantes de plasmide codant pour p53(R175H). Les dosages des activités luciférase et β -galactosidase sont réalisés après 18 h de récupération dans du DHG + 10 % FBS. Les résultats présentés à la figure 3.13 montrent que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 induite par la surexpression de la protéine p53 sauvage (20 fois par rapport aux cellules contrôles), diminue en fonction de la quantité de dominant négatif R175H co-transfecté. Ces données montrent donc que le dominant négatif de p53 (R175H) utilisé dans ces conditions de transfections et dans nos cellules, est capable d'inhiber significativement une réponse induite par la protéine p53, même surexprimée. De plus, les résultats de la figure 3.12 sont très intéressants puisqu'ils suggèrent que l'activité transcriptionnelle dépendante du facteur p53, plus élevée dans les cellules L929dADNmt, peut être inhibée non seulement par la surexpression d'un dominant négatif de p53 (p53R175H), mais également par la surexpression de K-CREB. Nous pouvons

donc suggérer que l'activité de p53 dans ces cellules est médiée par le facteur de transcription CREB. Ce facteur est d'ailleurs constitutivement activé et phosphorylé dans les cellules L929dADNmt (Arnould *et al.*, 2002) et il a été montré que l'abondance de cette interaction protéine-protéine entre CREB et p53 est médiée par le degré de phosphorylation du facteur CREB (Arnould *et al.*, 2002).

Possédant maintenant des outils moléculaires permettant d'inhiber la transcription dépendante de p53 dans les cellules L929dADNmt, nous allons rechercher l'effet d'une inhibition de l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 dans des cellules L929dADNmt sur l'expression de mtCLIC. Nous avons donc transfecté ou co-transfecté des cellules L929dADNmt avec les plasmides codant pour la GFP (cellules contrôles), pour K-CREB et / ou p53 (R175H). Les cellules, sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² sont transfectées ou co-transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec 5 µg de plasmide codant pour la GFP, K-CREB ou p53(R175H) ou 2,5 µg de chacun des deux derniers plasmides. Le milieu de transfection est ensuite remplacé et les cellules récupèrent 18 h dans 5 ml de DHG + 10 % FBS. Les cellules sont ensuite lysées avec un tampon contenant 1 % de triton X-100 et 50 µg de protéines sont chargés dans un gel NuPAGE 4-12 %. Les résultats, présentés à la figure 3.14, montrent que dans les cellules surexprimant p53 (R175H) et / ou K-CREB, le signal correspondant à l'abondance de mtCLIC est réduit. Sachant que les cellules L929dADNmt surexpriment mtCLIC en réponse à un stress mitochondrial, nous pouvons donc conclure que cette surexpression est probablement sous le contrôle de l'activité du facteur de transcription p53. De plus, le fait que la surexpression de K-CREB diminue l'abondance de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt, renforce encore l'hypothèse de la participation de CREB dans le contrôle de l'expression du gène cible de p53 codant la protéine mtCLIC dans les L929dADNmt. On remarque également que la surexpression conjointe des deux dominants négatifs n'a pas d'effet additif sur la diminution de l'expression de la protéine mtCLIC. Ces résultats suggèrent que les deux facteurs de transcription participent à la même voie de régulation dans le contrôle de l'expression de mtCLIC. Le modèle d'interaction protéine-protéine entre p53 et CREB, proposé par Giebler *et. al* (Fig 1.27) semble donc expliquer le contrôle de l'expression de mtCLIC dans nos conditions. De plus, nos résultats suggèrent que le dominant négatif K-CREB est capable de disrupter cette interaction. Il serait intéressant de tenter de le démontrer en testant l'effet d'une surexpression de K-CREB sur l'interaction CREB / p53 dans des expériences de co-immunoprécipitation.

Après avoir montré que l'expression de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt pouvait être diminuée par la surexpression des dominants négatifs de p53 et de CREB, nous allons tenter de vérifier l'implication de ces facteurs dans la surexpression de mtCLIC, induite dans les L929 par une stimulation au TNF α . Nous avons donc transfecté des cellules L929 avec des plasmides codants pour K-CREB, p53 (R175H) ou la protéine GFP (contrôle de transfection). Les cellules L929, sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² sont transfectées transitoirement pendant 6 h avec 5 μ g de ces plasmides.

Après 24 h de récupération dans du DHG + 10 % FBS, ces cellules ont ensuite été incubées ou non pendant 14 h avec du TNF α à 10 ng/ml. Au terme de cette incubation, une lyse cellulaire est effectuée avec un tampon contenant 1 % de triton X-100. L'abondance de mtCLIC a été analysée en Western blot à partir de 25 μ g des lysats clairs obtenus. Les résultats présentés à la figure 3.15 montrent et confirment que l'expression de la protéine mtCLIC dans les cellules L929 est bien induite par le TNF α à la concentration de 10 ng/ml. Cependant, dans les cellules qui surexpriment K-CREB, l'induction est légèrement diminuée. De plus, la surexpression de mtCLIC est presque complètement inhibée dans les cellules L929 qui surexpriment p53 (R175H).

Donc, on peut conclure de cette expérience que l'augmentation de l'expression de la protéine mtCLIC, induite par le TNF α , peut être inhibée en diminuant l'activité transcriptionnelle dépendante de p53. Le fait que le dominant négatif K-CREB inhibe également légèrement la surexpression de mtCLIC est compatible avec notre hypothèse. Cette faible inhibition de l'expression de mtCLIC, induite par le TNF α , en présence de K-CREB comparée à l'effet de K-CREB sur l'expression de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt pourrait également être le résultat d'un taux de transfection plus faible des cellules dans cette condition expérimentale.

Comme nous l'avons montré précédemment (Fig 3.1), les inhibiteurs métaboliques de l'activité mitochondriale induisent également une surexpression de la protéine mtCLIC. Cette surexpression pourrait également être médiée par une augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de p53, même si l'effet de l'antimycine A ou de l'oligomycine sur la stimulation de l'activité de transcription dépendante de p53 est faible (Fig 3.6). Nous avons donc recherché un lien potentiel entre les inhibiteurs des phosphorylations oxydatives, p53 et le contrôle de l'expression du gène codant la protéine mtCLIC. Des cellules L929, sous-cultivées dans des boîtes de 25 cm² ont donc été transfectées transitoirement pendant 6 h

au Superfect avec 5 μ g de plasmide codant le dominant négatif p53 (R175H) ou la GFP (contrôle de transfection). Après une récupération de 18 h dans du DHG + 10 % FBS, les cellules sont ensuite incubées ou non (contrôle de stimulation) pendant 6 h avec de l'antimycine A (1 μ M) ou du FCCP (10 μ M). Les cellules sont ensuite laissées 18 h dans du DHG + 10 % de FBS. L'abondance de mtCLIC a ensuite été recherchée par un Western blot réalisé avec 25 μ g de lysats clairs obtenus à partir de ces cellules (figure 3.16). Nous observons ici que l'antimycine A et le FCCP induisent la surexpression de mtCLIC dans les L929. Ces résultats confirment ceux obtenus à la figure 3.1. Par contre, dans les cellules L929 où l'activité transcriptionnelle dépendante de p53 est inhibée, la surexpression de la protéine mtCLIC induite par les inhibiteurs de l'activité mitochondriale n'est plus observée. Ces résultats confirment ainsi le rôle prépondérant de p53 dans la régulation de l'abondance de la protéine mtCLIC. Il serait intéressant de tester l'effet du dominant négatif K-CREB dans ces conditions.

L'ensemble de ces résultats confirment que l'augmentation d'expression de la protéine mtCLIC dans les cellules L929dADNmt, induite en réponse à un stress mitochondrial ou en réponse à une stimulation au TNF α , passe par l'activation du facteur de transcription p53. En effet, la surexpression de mtCLIC, induite par des inhibiteurs de l'activité mitochondriale comme l'antimycine A ou le FCCP, une cytokine comme le TNF α ou par la déplétion en ADN mitochondrial (Fig 3.1, 3.4, 3.9) semble médiée dans toutes ces conditions par une augmentation de l'activité de p53. De plus, la surexpression de mtCLIC est inhibée dans les cellules qui surexpriment le dominant négatif p53 (R175H). (Fig 3.14, 3.15, 3.16). Ce facteur de transcription semble donc impliqué dans la communication rétrograde entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. De plus, nous avons mis en évidence qu'un dominant négatif de CREB (K-CREB) est capable d'inhiber l'augmentation de la transcription dépendante de p53 (Figure 3.12). L'augmentation d'expression de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt et la surexpression de mtCLIC induite par le TNF α dans des L929 est également diminuée lorsque ces cellules surexpriment le dominant négatif K-CREB. Nous n'avons pas démontré cet effet pour les inhibiteurs mitochondriaux.

Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent que l'activité transcriptionnelle de p53, impliquée dans la régulation de l'expression de mtCLIC, passe en partie par le recrutement de CREB. Ceci est en accord avec les données obtenues précédemment au laboratoire qui montrent, par exemple, que CREB est phosphorylé sur la sérine 133 en réponse à une inhibition métabolique de la mitochondrie dans les cellules L929dADNmt. De plus, des

expériences d'immunoprécipitation ont montré que p53 et CREB interagissent physiquement dans les L929dADNmt (Arnould *et al.*, 2002), et que cette interaction est fonction de l'état de phosphorylation de CREB (Giebler *et al.*, 2000).

Nous pouvons donc postuler que l'expression de mtCLIC implique qu'un (ou plusieurs) messenger(s) secondaire(s) soi(en)t libérés par la mitochondrie. A ce moment de la discussion, rappelons que les conditions de différenciation des kératinocytes, qui entraînent une surexpression de mtCLIC, passent par une augmentation de la concentration en calcium extracellulaire (Fernandez-Salas *et al.*, 1999). De plus, dans les cellules déplétées en ADNmt, on observe une concentration cytosolique en calcium plus élevée (Arnould *et al.*, 2002). Dès lors, nous pouvons imaginer qu'en réponse à un stress mitochondrial, la concentration cytosolique en calcium augmenterait et pourrait activer certaines kinases dépendantes de la calmoduline. Les travaux de Arnould *et al.* ont également démontré que la CaMK IV est activée dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial et phosphoryle CREB sur la sérine 133. CREB activé pourrait ensuite interagir physiquement avec p53 et favoriser la transcription de certains gènes cibles comme celui codant pour mtCLIC, selon le modèle de Giebler et al (Fig 1.27). Si cette hypothèse est correcte, mtCLIC serait donc *in fine* un gène cible du calcium. Nous allons maintenant tester cette hypothèse en recherchant l'effet d'une incubation de nos cellules en présence d'ionomycine ou de BAPTA-AM sur l'expression de mtCLIC.

5.3.6 Recherche du rôle potentiel du calcium dans la régulation de l'abondance de la protéine mtCLIC

Afin de rechercher l'implication éventuelle du calcium dans la régulation de l'expression de la protéine mtCLIC, nous avons tout d'abord incubé ou non (cellules contrôles) des cellules L929 et L929dADNmt pendant 14 h avec différentes concentrations en ionomycine à 10, 100 et 1 μ M. L'ionomycine est un ionophore pour le calcium capable d'augmenter la concentration cytosolique en calcium libre dans la cellule (Bolkent *et al.*, 2002). En utilisant cette molécule, nous tentons donc de mimer le signal émis par la mitochondrie non fonctionnelle. L'expression de la protéine mtCLIC a ensuite été étudiée par un Western blot effectué à partir de 25 μ g de lysats clairs préparés au terme de ces incubations. Les résultats sont présentés à la figure 3.17.

On peut remarquer dans les cellules L929 (A), que l'ionophore induit une augmentation du signal mtCLIC pour les concentrations les plus fortes (100 nM et 1 μ M). Par contre, dans les cellules L929dADNmt (B), l'abondance de la protéine mtCLIC ne varie pas suite à une incubation des cellules avec l'ionophore, et ce, quelle que soit la concentration utilisée. Sachant que la concentration cytosolique en calcium est constitutivement plus élevée dans les cellules L929dADNmt (Arnould *et al.*, 2002), on peut émettre l'hypothèse que dans les cellules L929dADNmt, l'incubation en présence d'ionomycine a peu ou pas d'effet sur une voie de signalisation dépendante du calcium qui serait déjà activée. Si cette hypothèse est correcte, nous devrions pouvoir diminuer l'abondance de la protéine mtCLIC dans les cellules déplétées en ADNmt, en diminuant la concentration en calcium cytosolique.

Dans une deuxième approche, nous avons donc tenté d'abaisser la concentration en calcium cytosolique libre dans des cellules L929dADNmt. Les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial ont été incubées ou non (cellules contrôle) pendant 14 h avec du BAPTA-AM, un chélateur de calcium intracellulaire (Duchen *et al.*, 1998), à des concentrations de 1, 5, 10 et 20 μ M. Au terme de ces incubations, les cellules ont été lysées avec un tampon contenant 1 % de triton X-100 et l'abondance de la protéine mtCLIC a été recherchée par Western blot (fig 3.18). Sur cette figure, on observe que le BAPTA-AM est capable de diminuer l'abondance, et donc probablement l'expression de mtCLIC dans des cellules qui la surexpriment.

Les deux approches visant à rechercher l'effet d'une modification de la concentration en calcium cytosolique sur l'expression de la protéine mtCLIC ont donc permis de mettre en évidence l'implication de cet ion dans la régulation de l'expression de la protéine mtCLIC.

En conclusion, par rapport à notre modèle d'étude constitué de cellules L929dADNmt, nous avons confirmé que la protéine mtCLIC est plus abondante dans ces cellules et que la surexpression résulte bien de l'inhibition mitochondriale comme l'atteste l'effet des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives (Figure 3.1). Pour tenter de comprendre la régulation de l'expression de mtCLIC, nous avons utilisé des stimulations au TNF α et des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives, qui induisent la surexpression de mtCLIC. Cette induction semble nécessiter, dans ces deux conditions, l'activation du facteur de transcription p53. En effet, la diminution artificielle, par un dominant négatif, de l'activité transcriptionnelle de p53 inhibe la surexpression de mtCLIC induite par le TNF α et les inhibiteurs mitochondriaux (Fig 3.15, 3.16). Nous avons également confirmé que l'activité transcriptionnelle de p53 peut être modulée par CREB dans notre modèle cellulaire, et ce, en aval d'une voie de signalisation

probablement initiée par l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre dans ces cellules. En effet, l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium entraîne une surexpression de mtCLIC dans des cellules L929 (figure 3.17), et l'abondance de mtCLIC dans les cellules L929dADNmt a pu être diminuée en abaissant cette concentration (figure 3.18).

Avant de présenter nos résultats sur la recherche d'une fonction potentielle de mtCLIC dans les mitochondries des cellules L929dADNmt, nous avons comparé l'abondance de CLIC4, l'orthologue humain de mtCLIC dans d'autres modèles cellulaires présentant également un dysfonctionnement mitochondrial, telles que les cellules 143B, 143B \square^0 , et les cellules cybrides MERRF sauvages et mutées.

5.4 Recherche de l'abondance et de la localisation subcellulaire de l'orthologue humain de mtCLIC, CLIC4, dans des lignées cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial.

Nous disposons également, au laboratoire, de cellules issues d'un ostéosarcome humain, déplétées ou non en ADN mitochondrial, et appelées respectivement 143B \square^0 et 143B. Nous possédons également des cellules cybrides issues de la fusion de cellules 143B \square^0 avec des cellules anucléées (plaquettes) provenant soit d'une personne saine, soit d'un patient atteint de la pathologie MERRF, causée par une mutation ponctuelle dans le génome mitochondrial (A8344G). Ces cellules, repeuplées avec des mitochondries d'origines différentes, sont nommées respectivement MERRF sauvages et MERRF mutées. Ces quatre lignées sont décrites au point 2.1.1. Tout d'abord, afin de caractériser la déplétion en ADN mitochondrial des cellules 143B \square^0 et d'autre part de rechercher l'effet de la mutation présente dans les MERRF mutées sur la synthèse protéique mitochondriale, nous avons estimé l'abondance de la protéine COX I, codée par le génome mitochondrial, dans ces différentes lignées cellulaires.

Les cellules 143B, 143B \square^0 , MERRF sauvages et mutées sontensemencées sur des lames porte-objets dans des boîtes de 24 puits à une densité de 25000 cellules par puits et ce, trois jours avant le marquage. Le marquage est réalisé comme décrit précédemment, en utilisant un anticorps anti-COX I (figure 3.19). L'expression de la protéine COX I est complètement absente dans les cellules 143B \square^0 , comparativement aux cellules 143B parentales. Cette observation confirme l'efficacité de la déplétion en ADN mitochondrial et le

caractère clonal de la population. L'expression de la protéine COX I dans les cellules MERRF mutées semble également plus faible que dans les MERRF sauvages. La mutation A8344G entraîne en effet une diminution de la synthèse protéique mitochondriale (Masucci *et al.*, 1995).

Nous avons ensuite recherché l'effet du dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules 143B □⁰ et MERRF mutées sur l'expression de la protéine CLIC4 dans ces cellules. Nous avons donc réalisé un Western blot sur 25 □g de protéines de lysats clairs préparés à partir de cellules L929, L929dADNmt, 143B, 143B□⁰ et MERRF sauvages et mutées. L'analyse de l'expression des protéines CLIC4 et mtCLIC par Western blot, présentée à la figure 3.20 montre que la protéine CLIC4, tout comme mtCLIC dans les L929dADNmt, est surexprimée dans les lignées cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial. De plus, l'utilisation de l'anticorps 129 dirigé contre le domaine C-terminal de mtCLIC permet donc la reconnaissance de la protéine CLIC4 dans des lignées cellulaires humaines. En effet, les protéines mtCLIC et CLIC4 ne diffèrent que par 3 acides aminés. Cette observation a permis de suggérer que mtCLIC et CLIC4 sont les mêmes protéines dans deux espèces différentes (Fernandez-Salas *et al.*, 1999).

Afin de confirmer la surexpression de CLIC4 dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial, mais également de vérifier si la protéine CLIC4 est également localisée dans la mitochondrie, nous avons réalisé un double marquage en immunofluorescence sur des cellules 143B et 143B □⁰ ainsi que sur les cellules cybrides MERRF sauvages et mutées afin de visualiser la protéine CLIC4 et la protéine COX IV.

Les cellules ont donc été sous-cultivées sur des lames porte-objet dans des boîtes de 24 puits à une densité de 25000 cellules par puits. Le marquage a été effectué deux jours plus tard comme décrit précédemment. Les images obtenues en microscopie confocale sont présentées aux figures 3.21 et 3.22. Il ressort de ces observations que la protéine CLIC4 semble plus abondante dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. On constate également que, tout comme mtCLIC, CLIC4 possède une localisation en partie mitochondriale, comme illustré par la superposition des images obtenues pour chacun des marquages. L'expression de la protéine CLIC4 semble donc également régulée par le stress mitochondrial, et sa localisation mitochondriale renforce l'idée que CLIC4 et mtCLIC sont les mêmes protéines dans deux espèces différentes.

Etant donné que l'expression de mtCLIC est régulée par le facteur de transcription p53 dans les cellules L929 et L929dADNmt, nous avons recherché une activité éventuelle de p53 dans les cellules 143B, 143B \square^0 , MERRFwt et mutées. Nous avons donc réalisé un essai de transfection du rapporteur de l'activité transcriptionnelle de p53 dans ces cellules. Cette expérience n'a malheureusement pas donné de résultats concluant. L'optimisation des conditions de transfection pour ces lignées cellulaires est donc nécessaire avant de poursuivre les expériences impliquant des transfections. Nous avons également réalisé un test de liaison du facteur de transcription p53 à sa séquence consensus par la technique du dosage en multipuits, comme décrit précédemment. Les résultats présentés à la figure 3.23 suggèrent que la variation d'abondance de CLIC4, mise en évidence par Western blot et marquage en immunofluorescence dans les cellules 143B, 143B \square^0 , MERRF sauvages et mutées, ne semble pas être corrélée à une augmentation de la liaison de p53 à l'ADN. Cette situation avait déjà été observée pour les L929 et les L929dADNmt (figure 3.11).

La protéine mtCLIC, dont le gène a été cloné récemment (Fernandez-Salas *et al.*, 1999), est un canal à chlore mitochondrial dont l'expression semble induite par un stress mitochondrial. Bien que son implication dans l'apoptose dépendante de la mitochondrie a été récemment mise en évidence (Fernandez-Salas *et al.*, 2002), aucune fonction précise ne lui a été attribuée et aucune étude en électrophysiologie n'a été effectuée sur ce canal. Cette fonction hypothétique semble néanmoins importante pour la cellule, puisque malgré la moindre production d'ATP résultant du dysfonctionnement mitochondrial provoqué par la déplétion en ADNmt, son expression est augmentée.

5.5 Recherche d'une fonction biologique potentielle de la protéine mtCLIC dans les mitochondries de cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel que pouvait jouer mtCLIC au niveau de la mitochondrie, et plus particulièrement sur le maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules L929dADNmt.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction (point 1.3.1), les cellules déplétées en ADN mitochondrial ne sont plus en mesure d'assurer les phosphorylations oxydatives permettant la synthèse d'ATP. Le potentiel de membrane mitochondrial ne peut donc plus être maintenu par un gradient de protons généré par les complexes de la chaîne de transporteurs

d'électrons, dans ces cellules (Buchet *et al.*, 1998). Néanmoins, la cellule déplétée en ADN mitochondrial conserve quand même un certain potentiel de membrane, l'intensité de celui-ci variant en fonction de la lignée cellulaire concernée (Appleby *et al.*, 1999). Ce potentiel de membrane est donc probablement généré par un autre mécanisme. Une hypothèse proposée dans la littérature et expliquée au point 1.3.2.2 propose l'intervention de l'ANT et d'une forme incomplète et dissociée de la F₀-F₁ ATPsynthase. Le potentiel de membrane mitochondrial serait donc maintenu dans ces cellules par l'échange entre de l'ADP³⁻ mitochondrial contre de l'ATP⁴⁻ cytosolique. L'échange serait assuré par l'isoforme 2 de l'ANT, et la F₁ ATPase fournirait l'ADP³⁻ (Buchet *et al.*, 1998).

Des expériences antérieures menées au laboratoire ont montré, par analyse en microscopie électronique et par la visualisation en microscopie confocale de cellules marquées au Mitotracker Red, une sonde mitochondriale, que le nombre de mitochondries ne varie pas dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial par rapport aux cellules L929 parentales. Cette observation suggère donc que la mitobiogenèse est toujours active dans ces cellules privées de mitochondries actives. La structure de la mitochondrie, bien qu'énergétiquement non fonctionnelle est donc maintenue au cours des divisions cellulaires.

Dans un premier temps, nous avons donc voulu confirmer ces observations par un marquage au nonyl-acrydine orange (NAO) dans des cellules L929 et L929dADNmt afin d'estimer l'abondance de la population mitochondriale dans ces deux lignées. Le NAO est une sonde fluorescente qui se lie aux cardiolipines présentes dans la membrane mitochondriale interne (Mileykovskaya *et al.*, 2001). Les cellules,ensemencées la veille du marquage dans des boîtes de 24 puits à différentes densités, sont mises en présence de la sonde fluorescente NAO à 10 μ M pendant 30 min. Au terme de cette incubation, les cellules sont rincées et lysées. La fluorescence est ensuite mesurée au spectrofluorimètre sur 100 μ l de lysat clair obtenu après centrifugation. Les résultats sont présentés à la figure 3.24. On peut remarquer que la déplétion en ADN mitochondrial n'influence pas le nombre de mitochondries dans les cellules. En effet, les intensités de fluorescence, proportionnelles à l'accumulation de la sonde dans la mitochondrie, sont comparables dans les cellules L929 et les cellules L929dADNmt. De plus, les signaux de fluorescence sont proportionnels au nombre de cellules. Une préincubation des cellules L929 pendant 2 h en présence de FCCP à 1 μ M n'influence pas le marquage des cellules avec le NAO. Ce résultat suggère bien que le NAO marque les mitochondries par un mécanisme indépendant du potentiel de membrane mitochondrial (Mileykovskaya *et al.*, 2001).

Comme rapporté dans la littérature, le potentiel de membrane mitochondrial est en partie conservé dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial (Appleby *et al.*, 1999; Buchet *et al.*, 1998). Afin d'estimer l'importance du potentiel de membrane dans les cellules L929 et L929dADNmt, nous avons choisi d'utiliser la sonde fluorescente rhodamine 123, qui s'accumule dans les mitochondries couplées et est souvent utilisée dans ce type d'études (Scaduto *et al.*, 1999). Les cellules L929 et L929dADNmt, ensemencées la veille du marquage dans des boîtes de 24 puits à différentes densités, sont mises en présence de la sonde R123 à 10 μ M pendant 30 min. Au terme de cette incubation, les cellules sont rincées et lysées. La fluorescence est ensuite mesurée au spectrofluorimètre sur 100 μ l de lysat clair obtenu après centrifugation. Comme on peut le constater à la figure 3.25, il apparaît que, dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial, le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi$ m) est toujours présent bien qu'inférieur à celui des cellules L929. Il ne représente pour une densité de 80000 cellules par puits qu'environ 65% des cellules contrôles. On constate également que le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929, détecté par la fluorescence de la rhodamine 123 accumulée dans les mitochondries, est sensible à un découplage par le FCCP. En effet, lorsque les L929 sont préincubées 2 h avec du FCCP (1 μ M) avant le marquage, les intensités de fluorescence mesurées ne représentent plus que 45 % des cellules contrôles. Ce résultat montre que la rhodamine 123 s'accumule essentiellement dans des mitochondries couplées, et confirme donc la fiabilité de cette sonde pour la mesure du $\Delta\psi$ m dans nos conditions expérimentales.

Si l'hypothèse de Buchet *et al.* concernant le maintien du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial est correcte, on devrait observer une incorporation d'ATP dans les mitochondries de ces cellules. Des tests préliminaires réalisés au laboratoire sur la mesure de l'activité de l'ANT en présence d'ADP ou d'ATP marqués radioactivement ($[^{14}\text{C}]$ -ADP et $[^{14}\text{C}]$ -ATP) ont montré que c'est l'ADP et non l'ATP qui entre dans les mitochondries de ces cellules, et ce même après une préincubation des mitochondries en présence d'ADP afin de recharger le pool matriciel. Cette observation suggère dans notre modèle cellulaire que cette hypothèse ne semble pas vérifiée.

Les cellules L929dADNmt possèdent donc un certain potentiel de membrane mitochondrial, et surexpriment également un canal à chlore qui se localise au niveau de la membrane mitochondriale interne (Fernandez-Salas *et al.*, 2002). De par sa fonction de canal à chlore, mtCLIC pourrait autoriser un partage de charges de part et d'autres de la MMI et ainsi générer une différence de potentiel à ce niveau. L'hypothèse que nous proposons et que

nous allons tenter de vérifier dans les quelques expériences préliminaires qui suivent est que la protéine mtCLIC pourrait être impliquée dans le maintien du potentiel de membrane des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial.

Dès lors, afin de rechercher une implication éventuelle la protéine mtCLIC dans la génération d'un potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial, nous avons choisi deux approches. Dans la première, nous testerons l'effet d'inhibiteurs de canaux à chlore tel que l'IAA-94 sur le potentiel de membrane mitochondrial des cellules par un test d'incorporation à la R123. Dans une deuxième approche, nous tenterons de modifier l'abondance de la protéine mtCLIC par la transfection en utilisant les outils moléculaires dont nous avons montré qu'ils peuvent moduler l'abondance de mtCLIC dans nos cellules. Pour augmenter l'abondance de mtCLIC, nous transfecterons les cellules avec les plasmides codant pour la protéine mtCLIC sauvage ou une protéine de fusion mtCLIC-GFP. Afin de diminuer l'expression de mtCLIC, nous testerons l'effet de la surexpression de K-CREB et p53(R175H) dont l'effet sur mtCLIC a été démontré dans ce travail (figures 3.14, 3.15, 3.16).

Des cellules L929 et L929dADNmt ont donc été incubées en présence d'IAA-94, un inhibiteur non spécifique de canaux à chlore. Il est décrit dans la littérature que cet inhibiteur, bien que non spécifique, est capable d'inhiber les membres de la famille CLIC (Jentsch *et al.*, 2002). Les cellules L929 et L929dADNmt,ensemencées la veille à une densité de 200000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits, sont incubées ou non pendant 14 h avec différentes concentrations en IAA-94 (0.1, 1, 10, 50 et 100 μ M), puis placées au contact de la rhodamine 123 (10 μ M) pendant 30 min. Les cellules sont rincées et lysées au terme de cette incubation. La fluorescence est mesurée sur 100 μ l de lysat clair obtenu après centrifugation. Avant de réaliser le marquage à la rhodamine 123, des cellules L929 et L929dADNmt ont également été pré-incubées 2 h avec 10 μ M de FCCP. Les résultats présentés à la figure 3.26 montrent une réponse différente de ces deux lignées à l'IAA-94. Alors que le $\Delta\psi$ des cellules L929 y est insensible, celui des L929dADNmt diminue de manière dose-dépendante en fonction de la concentration en inhibiteur. Une autre donnée importante à observer est que le $\Delta\psi$ des L929dADNmt est insensible au FCCP contrairement à celui des L929. Le potentiel de membrane des cellules L929dADNmt n'apparaît donc pas comme généré par un gradient de protons, et semble impliquer la participation d'un mécanisme inhibé par l'IAA-94. Des résultats similaires ont été obtenus au laboratoire par Thierry Arnould sur des cellules

L929dADNmt incubées en présence de NPPB (5-Nitro-2-(3-PhenylPropylamino)-Benzoïc acid), un autre inhibiteur de canal à chlore (Jentsch *et al.*, 2002).

L'effet de ces inhibiteurs étant non spécifique, il n'est pas possible, avec ces résultats, d'impliquer directement mtCLIC dans le maintien d'un $\Delta\psi_m$ dans les cellules L929dADNmt. Nous avons donc ensuite recherché l'effet d'une modification d'abondance de la protéine mtCLIC, sur le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929dADNmt. Pour ce faire, nous avons fait appel à des expériences de surexpression de mtCLIC par transfection.

Des cellules L929dADNmt,ensemencées dans des boîtes de 24 puits à une densité de 25000 cellules par puits, ont donc été transfectées au Superfect pendant 6 h avec 1 μ g de plasmide codant pour la protéine mtCLIC ou pour une protéine de fusion mtCLIC-GFP. Le contrôle représente des cellules transfectées avec 1 μ g de vecteur codant la GFP. Après une période de récupération de 18 h dans du DHG + 10 % FBS, le potentiel de membrane mitochondrial a été estimé par un marquage à la rhodamine 123, comme précédemment. Les résultats présentés à la figure 3.27 montrent que dans les cellules L929dADNmt qui surexpriment mtCLIC ou mtCLIC-GFP, le potentiel de membrane mitochondrial augmente d'environ 40 %. Afin de vérifier qu'une partie de la protéine mtCLIC ou mtCLIC-GFP surexprimée est localisée au niveau de la mitochondrie, nous avons recherché l'expression de ces deux protéines en microscopie confocale. Nous avons dès lors transfecté transitoirement des cellules L929dADNmt pendant 6 h, sous-cultivées sur des lames porte-objet à une densité de 25000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits, avec 1 μ g de plasmide codant pour la protéine mtCLIC ou pour la protéine de fusion mtCLIC-GFP. Après une période de récupération de 24 h dans du DHG + 10 % FBS, nous avons ou non réalisé un double marquage en immunofluorescence comme décrit précédemment, en utilisant des anticorps dirigés contre mtCLIC (pour la forme non «taggée») et COX IV, la sous-unité IV de la cytochrome oxydase. La protéine de fusion mtCLIC-GFP fluoresce naturellement (Ex: 568 nm) et ne nécessite donc pas de traitement particulier pour sa visualisation en microscopie à fluorescence.

Les images obtenues après marquage et observations en microscopie confocale sont présentées à la figure 3.28. On peut constater sur cette figure que dans les cellules qui surexpriment mtCLIC ou mtCLIC-GFP, une certaine proportion des protéines est localisée dans la mitochondrie, comme l'atteste la superposition des images obtenues après le double marquage mtCLIC / COX IV ou mtCLIC-GFP / COX IV après respectivement surexpression de mtCLIC ou mtCLIC-GFP. Le fait que la protéine mtCLIC surexprimée soit localisée au

moins partiellement au niveau de la mitochondrie nous permet de penser que les effets observés sur le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929dADNmt pourraient être provoqués par les changements d'expression de la protéine mtCLIC dans la mitochondrie..

Comme nous l'avons montré précédemment, la surexpression de dominants négatifs p53(R175H) et K-CREB dans les cellules L929dADNmt permet de diminuer l'expression de la protéine mtCLIC (fig 3.14). Dès lors, dans une dernière expérience, nous avons utilisé ces outils moléculaires afin de confirmer l'implication de mtCLIC dans le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929dADNmt. Nous avons donc rechercher l'effet d'une surexpression de p53 (R175H) ou de K-CREB sur l'accumulation de la rhodamine 123 (R123) dans les mitochondries de cellules L929dADNmt

Les cellules L929dADNmt, ensemencées dans les puits d'une boîte de 24 puits à une densité cellulaire de 25000 cellules par puits, ont été transfectées au Superfect pendant 6 h avec 1 µg de plasmide codant pour les dominants négatifs p53R175H ou K-CREB. Après avoir récupéré pendant 24 h dans du DHG + 10 % FBS, le potentiel de membrane mitochondrial a été évalué comme décrit précédemment (Fig 3.28). Ces résultats montrent que dans les cellules L929dADNmt qui surexpriment p53 (R175H) ou K-CREB, des conditions désormais connue pour diminuer l'abondance de la protéine mtCLIC, le potentiel de membrane mitochondrial est également diminué de 40 à 50 %.

Nous pouvons donc conclure, au terme de ces expériences, qu'en modulant positivement ou négativement l'abondance de la protéine mtCLIC dans des cellules L929dADNmt, nous pouvons modifier le potentiel de membrane mitochondrial de ces cellules. En effet, ce potentiel est augmenté d'environ 40 % dans des cellules surexprimant mtCLIC et est diminué de 40 à 50 % lorsque les dominants négatifs de p53 et de K-CREB sont surexprimés. Ce potentiel de membrane mitochondrial observé dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial est donc, d'une manière ou d'une autre, dépendant de l'abondance et / ou de l'activité de la protéine mtCLIC. L'utilisation d'inhibiteurs de canaux à chlore comme l'IAA-94 et le NPPB entraîne en effet également une diminution du potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929dADNmt, mais n'a aucun effet sur celui des cellules L929. Ceci suggère donc bien que le potentiel de membrane mitochondrial est généré par des mécanismes différents dans ces deux lignées cellulaires et que la protéine mtCLIC

pourrait directement ou indirectement jouer un rôle dans la création et / ou le maintien de ce potentiel de membrane observé dans les mitochondries de L929 déplétées en ADN mitochondrial.

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La mitochondrie émerge petit à petit comme un passage obligé dans de nombreuses études. En effet, son implication dans de nombreuses voies métaboliques cellulaires, telles que la production d'ATP, l'homéostasie calcique, le métabolisme des acides gras mais également dans le phénomène de l'apoptose la rend indispensable au bon fonctionnement de la cellule. Il est dès lors évident qu'un dysfonctionnement mitochondrial représente un stress important pour la cellule, comme l'atteste les nombreuses pathologies qui y sont associées.

Afin de percevoir un dysfonctionnement mitochondrial, la cellule doit être capable d'intégrer des signaux émis par la mitochondrie non fonctionnelle. Cette communication moléculaire entre la mitochondrie et le noyau implique qu'un ou des messenger(s) secondaire(s) soi(en)t émis par la mitochondrie, et active(nt) certaines voies de transduction cytosoliques, dont certaines mènent à l'activation de facteurs de transcription (Arnould *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 1993). Actuellement, deux candidats sont principalement proposés pour jouer ce rôle de messenger secondaire entre la mitochondrie et le noyau □ le calcium (Biswas *et al.*, 1999) et les ROS (Suzuki *et al.*, 1998).

Dans ce type d'études sur la compréhension des mécanismes moléculaires entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau, les cellules déplétées en ADN mitochondrial (□⁰) constituent un outil précieux. Ces cellules se trouvent en effet dans un état de stress énergétique permanent et constituent un modèle d'étude privilégié. De plus, la possibilité de repeupler ces cellules □⁰ avec des mitochondries possédant des mutations ou des délétions responsables d'une pathologie mitochondriale permet d'obtenir des modèles plus pertinents pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de ce type de maladies (Kagawa *et al.*, 2001). Ces cellules cybrides ont d'ailleurs contribué à préciser l'origine mitochondriale de certaines pathologies, comme la pathologie MERRF (Chomyn *et al.*, 1991).

La cellule en conditions de stress énergétique chronique modifie probablement l'expression d'un ensemble de gènes pour assurer son adaptation. Dans le cadre d'un projet visant à identifier des gènes nucléaires différentiellement exprimés en cas de dysfonctionnement mitochondrial, une étude de «RT-PCR differential display» a été réalisée

au laboratoire sur des cellules L929 déplétées ou non en ADN mitochondrial. Cette étude a permis d'identifier une série de candidats potentiellement surexprimés en cas de stress énergétique chronique. Dans ce travail, nous avons réalisé une étude fonctionnelle sur un de ces candidats, mtCLIC, un canal à chlore intracellulaire, membre d'une famille récemment identifiée (Redhead *et al.*, 1992). L'étude qui rapporte le clonage du gène dans les kératinocytes de souris décrit également que l'abondance de cette protéine est régulée par le facteur de transcription p53, le TNF α et l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire (Fernandez-Salas *et al.*, 1999)

L'abondance de cette protéine mtCLIC semble donc augmentée dans des conditions de stress cellulaire, provoqué notamment par deux acteurs importants dans le déclenchement de l'apoptose, p53 et le TNF α . L'implication de mtCLIC dans le phénomène de l'apoptose a été récemment mise en évidence dans des kératinocytes. Dans ces cellules, la surexpression de mtCLIC est capable d'induire l'apoptose (Fernandez-Salas *et al.*, 2002). Par contre, l'abondance de mtCLIC endogène dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial ne semble pas induire l'apoptose.

Dans ces cellules, nous avons d'abord confirmé que la surexpression de mtCLIC est directement liée au stress mitochondrial en utilisant des inhibiteurs métaboliques de l'activité mitochondriale tels que l'antimycine A, l'oligomycine ou le FCCP.

En nous basant sur les éléments connus dans la littérature, un des buts de ce travail a donc été de comprendre et de rechercher les mécanismes qui régulent l'abondance de mtCLIC dans les cellules L929 et L929 déplétées en ADN mitochondrial, en étudiant notamment le rôle de p53, du TNF α et des inhibiteurs des phosphorylations oxydatives. Nous avons également tenté de rechercher les relations éventuelles liant ces différentes molécules.

Dans un premier temps, les effets du TNF α , des inhibiteurs métaboliques de l'activité mitochondriale et de p53 sur l'augmentation de l'abondance de mtCLIC dans les cellules L929 a été démontré. Ces trois stimulations induisent en effet la surexpression de mtCLIC dans ces cellules.

Nous avons ensuite utilisé un système rapporteur de l'activité transcriptionnelle de p53 pour démontrer que le TNF α était capable d'entraîner une augmentation d'activité du facteur de transcription p53. L'effet des inhibiteurs mitochondriaux sur l'activité transcriptionnelle de p53, bien que plus faible, montre également une petite augmentation d'activité de ce facteur dans les L929. Dans ce cas, il serait intéressant de réaliser des cinétiques afin de rechercher

l'activité de p53 au cours du temps, après la stimulation. Ceci afin de suivre l'activité dépendante de p53 entre 6 h et 14 h et de pouvoir éventuellement mieux corrélérer son activité à la surexpression de mtCLIC induite par ces inhibiteurs.

Grâce à ce système rapporteur, nous avons également montré que, dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial, le facteur de transcription p53 était plus actif que dans les cellules L929 parentales. Cette observation est donc corrélée à la surexpression de mtCLIC dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial.

L'implication du facteur de transcription p53 dans la surexpression de la protéine mtCLIC, induite par le TNF α , l'antimycine A, le FCCP, mais également dans les cellules L929dADNmt, a été clairement démontrée par l'effet du dominant négatif du facteur de transcription p53. En effet, on observe que l'augmentation d'expression de mtCLIC, induite dans ces conditions, par des cellules qui surexpriment ce dominant négatif p53(R175H) est plus faible.

Néanmoins, l'augmentation d'activité du facteur de transcription p53, corrélée à la surexpression de mtCLIC, ne passe pas par une stabilisation de la protéine ou une plus grande liaison à l'ADN. Cette activité accrue passe donc probablement par une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, et / ou le recrutement de certains co-activateurs (Prives *et al.*, 1999).

Dans la littérature, une hypothèse propose que l'interaction de p53 avec le facteur de transcription CREB favorise l'activité transcriptionnelle de p53 en agissant comme pont moléculaire entre p53 et le co-activateur CBP (Giebler *et al.*, 2000). L'utilisation d'un dominant négatif de CREB (K-CREB) nous a permis de confirmer que dans notre modèle cellulaire de L929 déplétées en ADN mitochondrial, l'interaction p53/ CREB/CBP pour expliquer l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 est probablement observée. En effet, dans les cellules qui surexpriment K-CREB, l'activité transcriptionnelle de p53 est inhibée. Il faudrait toutefois réaliser des expériences de co-immunoprécipitation afin de rechercher l'effet de la surexpression du dominant négatif K-CREB sur cette interaction p53 / CREB.

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui résulte d'un dysfonctionnement mitochondrial peut déclencher différentes voies de transduction dépendante du calcium et mener à l'activation de kinases. L'activation de la CaMK IV, qui phosphoryle CREB sur la sérine 133, a d'ailleurs été démontrée dans les cellules L929

déplétées en ADN mitochondrial, qui possèdent également une concentration intracellulaire en calcium plus élevée (Arnould *et al.*, 2002). Une fois activé, CREB pourrait donc interagir avec p53 et renforcer la transcription de certains gènes cibles, comme mtCLIC.

Dans notre modèle cellulaire, le rôle du calcium dans la régulation de l'abondance de mtCLIC a été démontré en utilisant un ionophore pour le calcium, l'ionomycine (Bolkent *et al.*, 2002), et un chélateur de calcium intracellulaire, le BAPTA-AM (Nakano *et al.*, 2002). Nous montrons que la surexpression de mtCLIC est induite dans des cellules L929 en augmentant la concentration intracellulaire en calcium. Par contre, dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial, l'expression de mtCLIC diminue quand la concentration en calcium cytosolique libre dans la cellule est réduite. La surexpression de mtCLIC dans les L929 déplétées en ADNmt pourrait donc être reliée à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. mtCLIC est donc probablement un gène cible du calcium.

Nous avons donc pu mettre en évidence que l'abondance de la protéine était déterminée par l'état d'activité de la mitochondrie. De plus, nous avons montré dans cette étude que l'abondance de l'orthologue humain de mtCLIC, CLIC4 était elle aussi augmentée dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial tel qu'une déplétion de l'ADNmt ou une mutation ponctuelle touchant le génome mitochondrial.

Par la suite, il serait intéressant de rechercher les modes de régulations de CLIC4 dans les cellules 143B, 143B \square^0 , MERRF sauvages et mutées en utilisant les mêmes approches que celles utilisées pour mtCLIC. L'optimisation des conditions de transfections ou le choix d'une autre approche pour surexprimer nos constructions dans ces lignées sera néanmoins nécessaire.

Une observation étonnante faite par différents groupes de travaillant sur les cellules \square^0 est que les cellules déplétées en ADN mitochondrial conservent un certain potentiel de membrane (Appleby *et al.*, 1999) (Buchet *et al.*, 1998). En effet, il est surprenant que, dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial, un potentiel de membrane mitochondrial soit maintenu en l'absence d'un gradient de protons généré par les transporteurs d'électrons au niveau de la membrane mitochondriale interne.

Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes donc intéressés au rôle éventuel que pouvait jouer mtCLIC dans le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial.

Nous avons pu mettre en évidence, en utilisant un inhibiteur de canaux à chlore comme l'IAA-94, que le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial, mesuré par l'accumulation de la sonde fluorescente Rhodamine 123, était maintenu par un mécanisme dépendant d'une manière ou d'une autre de l'anion chlore. Le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929 est quant à lui insensible à l'IAA-94.

Nous avons montré que la surexpression de mtCLIC permet d'augmenter le potentiel de membrane mitochondrial des cellules L929 déplétées en ADNmt, alors que la surexpression des dominants négatifs de p53 et CREB, qui diminuent l'abondance de mtCLIC dans la cellule, a permis de diminuer ce potentiel.

Au terme de cette étude, nous avons apporté une série d'informations nous renseignant sur les modes de régulation et la fonction de mtCLIC au sein des cellules L929 et L929 déplétées en ADN mitochondrial. Nous ne savons cependant pas si mtCLIC est impliquée directement ou indirectement dans le maintien du potentiel de membrane mitochondrial. C'est pourquoi la recherche et l'identification de partenaires éventuels de cette protéine, par un test double hybride dans la levure ou des co-immunoprécipitations suivies de gel à deux dimensions et d'analyses en spectrométrie de masse, pourraient nous renseigner sur l'importance de son implication dans cette fonction.

Une perspective très intéressante à ce travail serait de tenter de confirmer nos données par des études sur l'électrophysiologie du canal mtCLIC.

Premièrement, la mise en membrane de mtCLIC recombinante au sein de vésicules lipidiques reconstituées pourrait permettre de confirmer l'activité de canal à chlore de cette protéine et ensuite de la caractériser du point de vue électrophysiologique. Cette approche a d'ailleurs déjà été utilisée pour un autre membre de la famille CLIC, CLIC1 (Tulk *et al.*, 2000).

En plus de cette étude *in vitro*, une étude en électrophysiologie visant à mesurer les variations de conductance au chlore au niveau de la membrane mitochondriale interne par la technique du patch-clamp serait d'une grande utilité. Bien que cette approche paraisse élégante, elle risque d'être difficile à mettre en oeuvre en raison de la localisation en membrane mitochondriale interne de mtCLIC. Cette technique a néanmoins déjà été expérimentée sur des mitochondries de levures (Ballarin *et al.*, 1995). Nous pourrions en effet mesurer les variations de conductance au chlore au niveau de la MMI dans des cellules où l'expression de mtCLIC est induite ou réprimée, ainsi que dans les cellules L929dADNmt.

Enfin, sachant que, contrairement à ce qui est observé dans les kératinocytes, la surexpression de mtCLIC dans les L929dADNmt n'induit pas l'apoptose, on peut s'interroger sur les fonctions diverses que peut exercer mtCLIC sur le potentiel de membrane mitochondrial au niveau de la MMI.

Dans le cas d'un dysfonctionnement mitochondrial, elle pourrait assurer à la mitochondrie de conserver un potentiel de membrane suffisant pour permettre l'importation des protéines mitochondriales synthétisées dans le cytosol. En effet, les fonctions exercées par les mitochondries sont tellement importantes que la cellule, même déplétée en ADN mitochondrial, les conserve au cours de ses divisions. Certains auteurs suggèrent également que la raison d'être du potentiel de membrane dans les cellules \square^0 serait d'éviter la libération de molécules mitochondriales qui initierait l'apoptose dans ces cellules qui y sont encore sensibles (Jacobson *et al.*, 1993) (Jiang *et al.*, 1999).

7 BIBLIOGRAPHIE

- Abe M. K., K. T. Kahle *et al.*, *ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family*, J Biol Chem, 276, 21272-9., 2001.
- Andersson S. G. and C. G. Kurland, *Ancient and recent horizontal transfer events: the origins of mitochondria*, APMIS Suppl, 84, 5-14, 1998a.
- Andersson S. G., A. Zomorodipour *et al.*, *The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*, Nature, 396, 133-40., 1998b.
- Appleby R. D., W. K. Porteous *et al.*, *Quantitation and origin of the mitochondrial membrane potential in human cells lacking mitochondrial DNA*, Eur J Biochem, 262, 108-16., 1999.
- Arnould T., S. Vankoningsloo *et al.*, *CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation*, Embo J, 21, 53-63., 2002.
- Baker S. J., S. Markowitz *et al.*, *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53*, Science, 249, 912-5., 1990.
- Ballarin C. and M. C. Sorgato, *An electrophysiological study of yeast mitochondria. Evidence for two inner membrane anion channels sensitive to ATP*, J Biol Chem, 270, 19262-8., 1995.
- Bargonetti J. and J. J. Manfredi, *Multiple roles of the tumor suppressor p53*, Curr Opin Oncol, 14, 86-91., 2002.
- Bates S. and K. H. Vousden, *p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis*, Curr Opin Genet Dev, 6, 12-8., 1996.
- Baud V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*, Trends Cell Biol, 11, 372-7., 2001.
- Bauer M. F., S. Hofmann *et al.*, *Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes*, Trends Cell Biol, 10, 25-31, 2000.
- Berryman M. and A. Bretscher, *Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli*, Mol Biol Cell, 11, 1509-21., 2000.

- Biswas G., O. A. Adebajo *et al.*, *Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter- organelle crosstalk*, *Embo J*, 18, 522-33., 1999.
- Blagosklonny M. V., *P53: an ubiquitous target of anticancer drugs*, *Int J Cancer*, 98, 161-6., 2002.
- Bleazard W., J. M. McCaffery *et al.*, *The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast*, *Nat Cell Biol*, 1, 298-304., 1999.
- Bohr V. A. and G. L. Dianov, *Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA*, *Biochimie*, 81, 155-60, 1999.
- Boldogh I., N. Vojtov *et al.*, *Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p*, *J Cell Biol*, 141, 1371-81., 1998.
- Bolkent S. and K. Zierold, *Effects of the ionophores valinomycin, ionomycin and gramicidin A on the element compartmentation in cultured rat hepatocytes*, *Toxicol In Vitro*, 16, 159-65., 2002.
- Bradford M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, *Anal Biochem*, 72, 248-54., 1976.
- Brambilla L., G. Cairo *et al.*, *Mitochondrial respiratory chain deficiency leads to overexpression of antioxidant enzymes*, *FEBS Lett*, 418, 247-50, 1997.
- Buchet K. and C. Godinot, *Functional FI-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells*, *J Biol Chem*, 273, 22983-9., 1998.
- Buckman J. F., H. Hernandez *et al.*, *MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants*, *J Neurosci Methods*, 104, 165-76., 2001.
- Carafoli E., *Intracellular calcium homeostasis*, *Annu Rev Biochem*, 56, 395-433, 1987.
- Chandel N. S., E. Maltepe *et al.*, *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11715-20, 1998.
- Chandel N. S. and P. T. Schumacker, *Cells depleted of mitochondrial DNA (rho0) yield insight into physiological mechanisms*, *FEBS Lett*, 454, 173-6., 1999.
- Chatterjee A. and K. K. Singh, *Uracil-DNA glycosylase-deficient yeast exhibit a mitochondrial mutator phenotype*, *Nucleic Acids Res*, 29, 4935-40, 2001.

- Choi Y. S., S. Kim *et al.*, *Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes*, *Diabetes Res Clin Pract*, 54 Suppl 2, S3-9., 2001.
- Chomyn A., *The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics*, *Am J Hum Genet*, 62, 745-51., 1998.
- Chomyn A., G. Meola *et al.*, *In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria*, *Mol Cell Biol*, 11, 2236-44., 1991.
- Chuang J. Z., T. A. Milner *et al.*, *A 29 kDa intracellular chloride channel p64H1 is associated with large dense-core vesicles in rat hippocampal neurons*, *J Neurosci*, 19, 2919-28., 1999.
- Clapham J. C., J. R. Arch *et al.*, *Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean*, *Nature*, 406, 415-8., 2000.
- Colman M. S., C. A. Afshari *et al.*, *Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress*, *Mutat Res*, 462, 179-88., 2000.
- Cummins J. M., *Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome*, *Hum Reprod*, 15 Suppl 2, 92-101., 2000.
- Datta K., S. Sinha *et al.*, *Reactive oxygen species in health and disease*, *Natl Med J India*, 13, 304-10., 2000.
- Daum G., S. M. Gasser *et al.*, *Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria*, *J Biol Chem*, 257, 13075-80, 1982.
- David G., *Mitochondrial clearance of cytosolic Ca(2+) in stimulated lizard motor nerve terminals proceeds without progressive elevation of mitochondrial matrix [Ca(2+)]*, *J Neurosci*, 19, 7495-506, 1999.
- De Giorgi F., L. Lartigue *et al.*, *The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization*, *Faseb J*, 16, 607-9, 2002.
- Delbart C., *les mitochondries: biologie et incidence physiopathologiques*, 2000.
- Duchen M. R., *Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death*, *J Physiol*, 529 Pt 1, 57-68., 2000.
- Duchen M. R., A. Leyssens *et al.*, *Transient mitochondrial depolarizations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes*, *J Cell Biol*, 142, 975-88., 1998.

- Duncan R. R., P. K. Westwood *et al.*, *Rat brain p64H1, expression of a new member of the p64 chloride channel protein family in endoplasmic reticulum*, J Biol Chem, 272, 23880-6., 1997.
- Dutzler R., E. B. Campbell *et al.*, *X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity*, Nature, 415, 287-94, 2002.
- Echtay K. S., D. Roussel *et al.*, *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*, Nature, 415, 96-9, 2002.
- Edwards J. C., *A novel p64-related Cl⁻ channel: subcellular distribution and nephron segment-specific expression*, Am J Physiol, 276, F398-408, 1999.
- Edwards J. C., B. Tulk *et al.*, *Functional expression of p64, an intracellular chloride channel protein*, J Membr Biol, 163, 119-27., 1998.
- Enriquez J. A., J. Cabezas-Herrera *et al.*, *Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells*, J Biol Chem, 275, 11207-15, 2000.
- Ermak G. and K. J. Davies, *Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death*, Mol Immunol, 38, 713-21, 2002.
- Fahlke C., H. T. Yu *et al.*, *Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels*, Nature, 390, 529-32., 1997.
- Fernandez-Salas E., M. Sagar *et al.*, *p53 and tumor necrosis factor alpha regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein*, J Biol Chem, 274, 36488-97., 1999.
- Fernandez-Salas E., K. S. Suh *et al.*, *mtCLIC/CLIC4, an Organellar Chloride Channel Protein, Is Increased by DNA Damage and Participates in the Apoptotic Response to p53*, Mol Cell Biol, 22, 3610-3620., 2002.
- Fiore C., V. Trezeguet *et al.*, *The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects*, Biochimie, 80, 137-50., 1998.
- Forsythe J. A., B. H. Jiang *et al.*, *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*, Mol Cell Biol, 16, 4604-13., 1996.
- Gammie A. E., L. J. Kurihara *et al.*, *DNM1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast*, J Cell Biol, 130, 553-66., 1995.
- Geuskens M., N. Hardt *et al.*, *An autoradiographic demonstration of nuclear DNA replication by DNA polymerase alpha and of mitochondrial DNA synthesis by DNA polymerase gamma*, Nucleic Acids Res, 9, 1599-613., 1981.

- Giaccia A. J. and M. B. Kastan, *The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals*, Genes Dev, 12, 2973-83., 1998.
- Giebler H. A., I. Lemasson *et al.*, *p53 recruitment of CREB binding protein mediated through phosphorylated CREB: a novel pathway of tumor suppressor regulation*, Mol Cell Biol, 20, 4849-58., 2000.
- Goldstein J. C., N. J. Waterhouse *et al.*, *The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant*, Nat Cell Biol, 2, 156-62, 2000.
- Gopalakrishnan L. and R. C. Scarpulla, *Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB- dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression*, J Biol Chem, 269, 105-13., 1994.
- Goto Y. and I. Nonaka, *[Mitochondrial encephalomyopathies: 3243 mutation as a central matter]*, Rinsho Shinkeigaku, 35, 1425-6., 1995.
- Graeber T. G., J. F. Peterson *et al.*, *Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1- phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status*, Mol Cell Biol, 14, 6264-77., 1994.
- Gray M. W., G. Burger *et al.*, *The origin and early evolution of mitochondria*, Genome Biol, 2, REVIEWS1018, 2001.
- Gray M. W., B. F. Lang *et al.*, *Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs*, Nucleic Acids Res, 26, 865-78., 1998.
- Gregoire M., R. Morais *et al.*, *On auxotrophy for pyrimidines of respiration-deficient chick embryo cells*, Eur J Biochem, 142, 49-55., 1984.
- Griffiths E. J., C. J. Ocampo *et al.*, *Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes*, Cardiovasc Res, 39, 423-33., 1998.
- Gunther W., A. Luchow *et al.*, *ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 8075-80., 1998.
- Guthrie P. B., J. Knappenberger *et al.*, *ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves*, J Neurosci, 19, 520-8, 1999.
- Hajnoczky G., G. Csordas *et al.*, *Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals*, Cell Calcium, 28, 349-63., 2000.
- Hales K. G. and M. T. Fuller, *Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase*, Cell, 90, 121-9., 1997.

- Heiss N. S. and A. Poustka, *Genomic structure of a novel chloride channel gene, CLIC2, in Xq28*, Genomics, 45, 224-8., 1997.
- Herzberg N. H., E. Middelkoop *et al.*, *Mitochondria in cultured human muscle cells depleted of mitochondrial DNA*, Eur J Cell Biol, 61, 400-8., 1993.
- Higuchi M., B. B. Aggarwal *et al.*, *Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function*, J Clin Invest, 99, 1751-8., 1997.
- Holt I. J., A. E. Harding *et al.*, *A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy*, Am J Hum Genet, 46, 428-33, 1990.
- Horst M., A. Azem *et al.*, *What is the driving force for protein import into mitochondria?*, Biochim Biophys Acta, 1318, 71-8, 1997.
- Humphreys D. T. and M. R. Wilson, *Modes of L929 cell death induced by TNF-alpha and other cytotoxic agents*, Cytokine, 11, 773-82, 1999.
- Inoue K., K. Nakada *et al.*, *Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes*, Nat Genet, 26, 176-81., 2000.
- Ito S., S. Ohta *et al.*, *Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 2099-103., 1999.
- Jacobson M. D., J. F. Burne *et al.*, *Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA*, Nature, 361, 365-9, 1993.
- Jentsch T. J., V. Stein *et al.*, *Molecular structure and physiological function of chloride channels*, Physiol Rev, 82, 503-68., 2002.
- Jentsch T. J., K. Steinmeyer *et al.*, *Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in Xenopus oocytes*, Nature, 348, 510-4., 1990.
- Jiang S., J. Cai *et al.*, *Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved*, J Biol Chem, 274, 29905-11., 1999.
- Jun A. S., M. D. Brown *et al.*, *A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia*, Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 6206-10, 1994.
- Kagawa Y., Y. Inoki *et al.*, *Gene therapy by mitochondrial transfer*, Adv Drug Deliv Rev, 49, 107-19., 2001.
- Kakinuma K., A. Boveris *et al.*, *H2O2 generation in subcellular fractions of leukocytes assayed by cytochrome c peroxidase method*, FEBS Lett, 74, 295-9., 1977.

- Kaneda H., J. Hayashi *et al.*, *Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis*, Proc Natl Acad Sci U S A, **92**, 4542-6., 1995.
- Kennedy E. D., P. Maechler *et al.*, *Effects of depletion of mitochondrial DNA in metabolism secretion coupling in INS-1 cells*, Diabetes, **47**, 374-80., 1998.
- Kim H. P., J. H. Roe *et al.*, *Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate*, J Biol Chem, **274**, 37455-60., 1999.
- Kim K. S., K. Takeda *et al.*, *Protection from reoxygenation injury by inhibition of rac1*, J Clin Invest, **101**, 1821-6, 1998.
- King M. P. and G. Attardi, *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation*, Science, **246**, 500-3., 1989.
- Kitamura Y., S. Shimohama *et al.*, *Changes of p53 in the brains of patients with Alzheimer's disease*, Biochem Biophys Res Commun, **232**, 418-21., 1997.
- Kobayashi Y., M. Y. Momoi *et al.*, *A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke- like episodes)*, Biochem Biophys Res Commun, **173**, 816-22., 1990.
- Kozak L. P. and M. E. Harper, *Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure*, Annu Rev Nutr, **20**, 339-63, 2000.
- Kroemer G. and J. C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*, Nat Med, **6**, 513-9., 2000.
- Laderman K. A., J. R. Penny *et al.*, *Aging-dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts transferred into mtDNA-less cells*, J Biol Chem, **271**, 15891-7., 1996.
- Laemmli U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature, **227**, 680-5., 1970.
- Landry D. W., M. H. Akabas *et al.*, *Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea*, Science, **244**, 1469-72., 1989.
- Lenaz G., *Role of mitochondria in oxidative stress and ageing*, Biochim Biophys Acta, **1366**, 53-67., 1998.
- Levy A. P., N. S. Levy *et al.*, *Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes*, Circ Res, **76**, 758-66., 1995.
- Li X. and S. A. Weinman, *CHLORIDE CHANNELS AND HEPATOCELLULAR FUNCTION: Prospects for Molecular Identification*, Annu Rev Physiol, **64**, 609-33, 2002.

- Liao X. and R. A. Butow, *RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus*, Cell, 72, 61-71., 1993.
- Linden M., B. D. Nelson *et al.*, *Studies on the interaction between mitochondria and the cytoskeleton*, J Bioenerg Biomembr, 21, 507-18., 1989.
- MacEwan D. J., *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*, Cell Signal, 14, 477-92., 2002.
- Maechler P. and C. B. Wollheim, *Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell*, J Physiol, 529 Pt 1, 49-56, 2000.
- Mannella C. A., *Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications*, J Struct Biol, 121, 207-18, 1998.
- Margulis L., *Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof*, Symp Soc Exp Biol, 29, 21-38, 1975.
- Masucci J. P., M. Davidson *et al.*, *In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged- red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys)gene: two genotypes produce similar phenotypes*, Mol Cell Biol, 15, 2872-81., 1995.
- Medvedev A. V., S. K. Snedden *et al.*, *Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent activation*, J Biol Chem, 276, 10817-23., 2001.
- Michael D. and M. Oren, *The p53 and Mdm2 families in cancer*, Curr Opin Genet Dev, 12, 53-9., 2002.
- Mileykovskaya E., W. Dowhan *et al.*, *Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces*, FEBS Lett, 507, 187-90., 2001.
- Miller S. W., P. A. Trimmer *et al.*, *Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties*, J Neurochem, 67, 1897-907., 1996.
- Mindell J. A. and M. Maduke, *ClC chloride channels*, Genome Biol, 2, REVIEWS3003, 2001.
- Miranda S., R. Foncea *et al.*, *Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells*, Biochem Biophys Res Commun, 258, 44-9., 1999.
- Mohammad-Panah R., C. Ackerley *et al.*, *The chloride channel ClC-4 co-localizes with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and may mediate chloride flux across the apical membrane of intestinal epithelia*, J Biol Chem, 277, 566-74., 2002.

- Montero M., M. T. Alonso *et al.*, *Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion*, *Nat Cell Biol*, 2, 57-61., 2000.
- Morais R., *Isolation of avian mitochondrial DNA-less cells*, *Methods Enzymol*, 264, 296-304, 1996.
- Munnich A. and P. Rustin, *Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders*, *Am J Med Genet*, 106, 4-17., 2001.
- Nakano K., S. Suga *et al.*, *Intracellular Ca(2+) modulation of ATP-sensitive K(+) channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic beta-cells*, *Endocrinology*, 143, 569-76., 2002.
- Nass M. M., *Abnormal DNA patterns in animal mitochondria: ethidium bromide-induced breakdown of closed circular DNA and conditions leading to oligomer accumulation*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67, 1926-33., 1970.
- Newkirk J. E., R. W. Taylor *et al.*, *Maternally inherited diabetes and deafness: prevalence in a hospital diabetic population*, *Diabet Med*, 14, 457-60., 1997.
- Nijtmans L. G., N. S. Henderson *et al.*, *Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene*, *J Biol Chem*, 276, 6755-62, 2001.
- Nishizawa T., T. Nagao *et al.*, *Molecular cloning and characterization of a novel chloride intracellular channel-related protein, parchorin, expressed in water- secreting cells*, *J Biol Chem*, 275, 11164-73., 2000.
- Novotny E. J., Jr., G. Singh *et al.*, *Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease*, *Neurology*, 36, 1053-60, 1986.
- Nunnari J., W. F. Marshall *et al.*, *Mitochondrial transmission during mating in Saccharomyces cerevisiae is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA*, *Mol Biol Cell*, 8, 1233-42., 1997.
-
- Paradies G., G. Petrosillo *et al.*, *The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles*, *FEBS Lett*, 466, 323-6., 2000.
- Parikh V. S., M. M. Morgan *et al.*, *The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast*, *Science*, 235, 576-80., 1987.
- Perkins G. A. and T. G. Frey, *Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy*, *Micron*, 31, 97-111., 2000.
- Prives C. and P. A. Hall, *The p53 pathway*, *J Pathol*, 187, 112-26., 1999.

- Qian Z., D. Okuhara *et al.*, *Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel*, J Biol Chem, 274, 1621-7, 1999.
- Quinton P. M., *Cystic fibrosis. Righting the wrong protein*, Nature, 347, 226., 1990.
- Radsak K., K. Kato *et al.*, *Effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA and cytochrome synthesis in HeLa cells*, Exp Cell Res, 66, 410-6., 1971.
- Raha S. and B. H. Robinson, *Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis*, Am J Med Genet, 106, 62-70., 2001.
- Rawn D. J., *TRAITÉ DE Biochimie*, in (Eds), De Boeck Université, 1990.
- Redhead C. R., A. E. Edelman *et al.*, *A ubiquitous 64-kDa protein is a component of a chloride channel of plasma and intracellular membranes*, Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 3716-20., 1992.
- Renard P., I. Ernest *et al.*, *Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB*, Nucleic Acids Res, 29, E21., 2001.
- Rial E., M. Gonzalez-Barroso *et al.*, *Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2*, Embo J, 18, 5827-33, 1999.
- Riordan J. R., J. M. Rommens *et al.*, *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*, Science, 245, 1066-73., 1989.
- Rizzuto R., P. Bernardi *et al.*, *Mitochondria as all-round players of the calcium game*, J Physiol, 529 Pt 1, 37-47, 2000.
- Rizzuto R., P. Pinton *et al.*, *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses*, Science, 280, 1763-6, 1998.
- Robb-Gaspers L. D., P. Burnett *et al.*, *Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses*, Embo J, 17, 4987-5000, 1998.
- Rustin P. and A. Rotig, *Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases*, Biochim Biophys Acta, 1553, 117-22., 2002.
- Sabapathy K., M. Klemm *et al.*, *Regulation of ES cell differentiation by functional and conformational modulation of p53*, Embo J, 16, 6217-29., 1997.
- Salvioli S., A. Ardizzoni *et al.*, *JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis*, FEBS Lett, 411, 77-82., 1997.
- Sankarapandi S. and J. L. Zweier, *Evidence against the generation of free hydroxyl radicals from the interaction of copper,zinc-superoxide dismutase and hydrogen peroxide*, J Biol Chem, 274, 34576-83., 1999.

- Saraste M., *Oxidative phosphorylation at the fin de siecle*, Science, 283, 1488-93., 1999.
- Scaduto R. C., Jr. and L. W. Grotyohann, *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*, Biophys J, 76, 469-77., 1999.
- Schmidt-Rose T. and T. J. Jentsch, *Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1*, J Biol Chem, 272, 20515-21., 1997.
- Schon E. A., E. Bonilla *et al.*, *Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis*, J Bioenerg Biomembr, 29, 131-49, 1997.
- Schriever A. M., T. Friedrich *et al.*, *CLC chloride channels in Caenorhabditis elegans*, J Biol Chem, 274, 34238-44., 1999.
- Schwake M., T. Friedrich *et al.*, *An internalization signal in CLC-5, an endosomal Cl-channel mutated in dent's disease*, J Biol Chem, 276, 12049-54., 2001.
- Sekito T., J. Thornton *et al.*, *Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p*, Mol Biol Cell, 11, 2103-15., 2000.
- Semenza G. L., *Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis*, Curr Opin Genet Dev, 8, 588-94., 1998.
- Semenza G. L., *Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*, Annu Rev Cell Dev Biol, 15, 551-78, 1999.
- Serrano M., A. W. Lin *et al.*, *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*, Cell, 88, 593-602., 1997.
- Sheng M., G. McFadden *et al.*, *Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB*, Neuron, 4, 571-82., 1990.
- Shigenaga M. K., T. M. Hagen *et al.*, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*, Proc Natl Acad Sci U S A, 91, 10771-8, 1994.
- Shimizu S., M. Narita *et al.*, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*, Nature, 399, 483-7, 1999.
- Shoffner J. M., M. G. Bialer *et al.*, *Mitochondrial encephalomyopathy associated with a single nucleotide pair deletion in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene*, Neurology, 45, 286-92, 1995.
- Shoffner J. M., M. T. Lott *et al.*, *Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation*, Cell, 61, 931-7, 1990.
- Smirnova E., L. Griparic *et al.*, *Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells*, Mol Biol Cell, 12, 2245-56., 2001.

- Smith C. A., *Absence of ethidium bromide induced nicking and degradation of mitochondrial DNA in mouse L-cells*, Nucleic Acids Res, 4, 1419-27, 1977.
- Smith M. L. and A. J. Fornace, Jr., *p53-mediated protective responses to UV irradiation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 12255-7., 1997.
- Sobreira C., M. P. King *et al.*, *Long-term analysis of differentiation in human myoblasts repopulated with mitochondria harboring mtDNA mutations*, Biochem Biophys Res Commun, 266, 179-86., 1999.
- Susin S. A., H. K. Lorenzo *et al.*, *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*, Nature, 397, 441-6, 1999.
- Suzuki H., T. Kumagai *et al.*, *Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells*, Biochem Biophys Res Commun, 249, 542-5., 1998.
- Takai D., K. Isobe *et al.*, *Transcomplementation between different types of respiration-deficient mitochondria with different pathogenic mutant mitochondrial DNAs*, J Biol Chem, 274, 11199-202., 1999.
- Tilly B. C., G. M. Mancini *et al.*, *Nucleotide-activated chloride channels in lysosomal membranes*, Biochem Biophys Res Commun, 187, 254-60., 1992.
- Tsuboi A., E. S. Masuda *et al.*, *Calcineurin potentiates activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in T cells: involvement of the conserved lymphokine element 0*, Mol Biol Cell, 5, 119-28., 1994.
- Tsuruzoe K., E. Araki *et al.*, *Creation and characterization of a mitochondrial DNA-depleted pancreatic beta-cell line: impaired insulin secretion induced by glucose, leucine, and sulfonylureas*, Diabetes, 47, 621-31., 1998.
- Tulk B. M., P. H. Schlesinger *et al.*, *CLIC-1 functions as a chloride channel when expressed and purified from bacteria*, J Biol Chem, 275, 26986-93, 2000.
- Urushidani T., D. Chow *et al.*, *Redistribution of a 120 kDa phosphoprotein in the parietal cell associated with stimulation*, J Membr Biol, 168, 209-20., 1999.
- Valenzuela S. M., D. K. Martin *et al.*, *Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei*, J Biol Chem, 272, 12575-82., 1997.
- Valenzuela S. M., M. Mazzanti *et al.*, *The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle*, J Physiol, 529 Pt 3, 541-52., 2000.
- Vassalli P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*, Annu Rev Immunol, 10, 411-52, 1992.
- Wallace D. C., *Mitochondrial diseases in man and mouse*, Science, 283, 1482-8., 1999.

- Wallace D. C., *Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease*, Am Heart J, 139, S70-85., 2000.
- Wallace D. C., *Mouse models for mitochondrial disease*, Am J Med Genet, 106, 71-93., 2001.
- Wallace D. C., M. T. Lott *et al.*, *Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations*, J Inherit Metab Dis, 15, 472-9, 1992.
- Wallace D. C., J. M. Shoffner *et al.*, *Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging*, Biochim Biophys Acta, 1271, 141-51, 1995.
- Wallace D. C., G. Singh *et al.*, *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*, Science, 242, 1427-30., 1988a.
- Wallace D. C., J. H. Ye *et al.*, *Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations*, Curr Genet, 12, 81-90, 1987.
- Wallace D. C., X. X. Zheng *et al.*, *Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease*, Cell, 55, 601-10, 1988b.
- Walton K. M., R. P. Rehfuss *et al.*, *A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)- regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo*, Mol Endocrinol, 6, 647-55, 1992.
- Wu G. Y., K. Deisseroth *et al.*, *Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen- activated protein kinase pathway*, Proc Natl Acad Sci U S A, 98, 2808-13., 2001.
- Yaffe M. P., *Dynamic mitochondria*, Nat Cell Biol, 1, E149-50., 1999.
- Yahanda A. M., J. M. Bruner *et al.*, *Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep in vitro model for development of malignant gliomas*, Mol Cell Biol, 15, 4249-59., 1995.

